

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

**NADİR GÖRÜLEN HEMATOLOJİK HASTALIKLARDA
GEN DEĞİŞİMLERİNİN TÜRK POPULASYONUNDA BELİRLENMESİ**

DİDEM TORUN

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Erkan YILMAZ

Temmuz

2013

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Didem Torun

KABUL ONAY

Doç. Dr. Erkan YILMAZ danışmanlığında Didem TORUN tarafından hazırlanan bu çalışma 31.07.2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Erkan YILMAZ

İmza:

Üye: Prof. Dr. Nejat AKAR

İmza:

Üye: Yrd. Doç.Dr. Türker DUMAN

İmza:

Üye: Prof. Dr. İbrahim HAZNEDAROĞLU

İmza:

Üye: Prof. Dr. Namık Yaşar ÖZBEK

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

.....

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

NADİR GÖRÜLEN HEMATOLOJİK HASTALIKLARDA GEN DEĞİŞİMLERİNİN TÜRK POPULASYONUNDA BELİRLENMESİ

Didem TORUN

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Doç. Dr. Erkan YILMAZ

Nadir görülen hematolojik hastalıkların genel populasyonda görülme sıklığı 1/500000-1/iki milyon arasında değişmekte olup bu hastalıklar akraba evliliklerinin yüksek olduğu toplumlarda önemli klinik ve sosyal sorun olarak kendini göstermektedirler. Nadir görülen kanama bozukluklarından etkilenen hastalar potansiyel olarak ciddi yaşamı tehdit eden kanamalar için hafif veya orta şiddette kanama eğilimi gösteren farklı klinik belirtilerden oluşan geniş spektrum gösterirler. Farklı kalıtım modeli gösteren bu hastalıkların %3-5 ini koagülasyon faktörlerinin eksikliği oluşturmaktadır.

Bu çalışmada nadir görülen hastalıklar kapsamında Türkiye'nin her tarafından çalışma konusu kapsamında belirlediğimiz hastalıklar olan pediatrik inme, homosistinüri, afibrinojenemi, makrotrombositopeni, FV+FVIII kombine eksikliği ve Glanzmann trombasteni hastalarına ait kanlar toplanarak bu kanlardan elde edilen DNA lar hastalıklarla ilişkili genler olan sırasıyla PCI, CBS, FGB, MYH9, ERGIC-53, MCFD2, GpIIB(ITGA2B) ve GpIII(ITGB3) genlerinde taranmıştır. Çalışmada Türk populasyonunda nadir görülen hastalıklarda sık görülen mutasyonların ortaya konması ve daha sonraki çalışmalarda mutasyon analizi yaparken bu değişiklikler öncelikli olarak taranarak hem zaman hem de maliyet açısından fayda sağlanması amaçlanmıştır.

Çalışmada literatürde daha önce tanımlanmayan PCI geninde p.S188N, CBS geninde 855_965ins110, ERGIC-53 geninde 2333delT, p.R202X, p.M354A, MYH9 geninde

p.L64A, p.S96A, p.S1195A, p.L1176M, FGB geninde p.L189P, ITGA2B geninde p.S415R, p. G159V, p.V420L, p.T646A mutasyonları saptanmıştır. Bu tez çalışması Türk popülasyonunda pediatrik inme ile PCI gen arasındaki ilişkiyi ortaya koyan ilk çalışma olması ve tanımlanmamış olan mutasyonların literatüre kazandırılmış olması nedeniyle önemlidir.

2013, 142 sayfa

Anahtar kelimeler: Nadir hematolojik hastalıklar, PCI, FGB, ERGIC-53, MCFD2, MYH9, ITGA2B, ITGB3, mutasyon, polimorfizm

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION OF THE GENE ALTERATION IN PATIENTS WITH RARE HAEMATOLOGIC DISORDER AT TURKISH POPULATION

Didem Torun

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assoc. Prof. Erkan Yılmaz

Frequency of the rare bleeding disorders (RBDs) in the general population ranges from 1:500.000 to 1:2 millions. In countries with a high rate of consanguineous marriages RBDs occur more frequently, representing a significant clinical and social problem. Patients affected by RBDs have a wide spectrum of clinical symptoms that vary from a mild or moderate bleeding tendency to potentially serious or life-threatening haemorrhages. RBDs are autosomal recessive disorders and representing 3–5% of all the inherited deficiencies of coagulation factors.

Rare diseases with in the scope of this study, blood samples of patients with stroke, homocystinuria, FV and FVIII combined deficiency, afibrinogenemia, macrothrombocytopenia and Glanzmann thrombasthenia syndrome were collected. Genomic DNA was extracted from whole blood by using standard phenol-chloroform method. The genes associated with these diseases PCI, CBS, ERGIC-53, MCFD2, FGB, MYH9 and GpIIB(ITGA2B), GpIIIA (ITGB3) were screened respectively. In this study, we aimed to reveal the common mutations in rare diseases at Turkish population. In future studies while mutation analysis, these changes screening as a priority that is intended to provide benefits in terms of both time and cost.

We identified novel mutations: p.S188N at PCI gene, 855_965ins110 at CBS gene, 2333delT, p.R202X, p.M354A mutations at ERGIC-53 gene, p.L64A, p.S96A, p.S1195A, p.L1176M mutations at MYH9 gene, p.L189P mutation at FGB gene and p.S415R, p. G159V, p.V420L, p.T646A mutations at GpIIB (ITGA2B) gene.

Further comparison of molecular, biochemical and clinical studies will enable to us understand how the mutations affect the expression of the genes and so that we may able to solve the mechanism of underlying diseases

So far, there is no study demonstrating the relation between PCI gene mutations and pediatric stroke.

2013, 142 pages

Key words: Rare hematologic diseases, Protein C Inhibitor gene (PCI), Fibrinogen beta chain gene (FGB), Endoplasmic reticulum-Golgi Intermediate Compartment (ERGIC-53), Multipl Coagulation Factor Deficiency (MCFD2), Myosine Heavy Chain Gene (MYH9), Glycoprotein IIB Gene (ITGA2B), Glycoprotein IIIA Gene (ITGB3),mutation, polymorphism

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca eşsiz bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, çalışmalarımda yol gösteren, iyi bir bilim insanı olma konusunda sağlam izlenimler edinmemi sağlayan, öğrencisi olduğum için her zaman gurur duyacağım, doktora tezimde ilk danışmanlığımı yapan hocam Sayın Prof. Dr. Nejat Akar'a

Ve onun emekliliğinden sonra danışmanlığımı üstlenen tezimin her aşamasıyla yakından ilgilenen, tecrübeleriyle, değerli fikirleriyle ve arkadaşlığıyla her zaman yanımda olan hocam Sayın Doç.Dr. Erkan Yılmaz'a,

Doktora çalışmamı finansal olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (TÜBİTAK-BİDEB) ve değerli çalışanlarına,

Bu çalışmada hasta örneklerinin toplanması konusunda çok büyük katkıları olan Ankara Üniversitesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Mehmet Ertem'e ve Prof.Dr. Zümrüt Uysal'a, Pediatrik Nöroloji Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Gülhis Deda, İzmir Behçet Uz Çocuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı'ndan Doç. Dr. Yeşim Oymak'a, GATA Hematoloji Bilim Dalı'dan Prof. Dr.Emin Kürekçi'ye, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Nazan Sarper'e, İstanbul Şişli Etfal Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı'ndan Doç.Dr.Yıldız Yıldırım'a, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan Dr. Sinan Akbayram'a, Konya Selçuk Üniversitesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı'ndan Prof.Dr. Ümran Çalışkan'a ,

Yüksek lisans ve doktora öğrenimim boyunca dostluğu ve yardımlarıyla hep yanımda olan sevgili arkadaşım, dostum Dr. Afife Güleç'e ve bana her konuda destek olan çalışma ortamı dışında hayatın keyifli anlarını paylaştığım arkadaşlarım Uzm.Bio. Seda Yılmaz ve Dr. Aslı Sırmacı'ya,

Çalışmalarım süresince çok kıymetli desteklerini hissettiğim, bu tezi yaparken ve yazarken sıcak çalışma ortamını paylaşmaktan büyük keyif aldığım başta Dr. Ayşenur Öztürk ve Dr. Duygu Duman olmak üzere tüm Ankara Üniversitesi Pediatrik Moleküler Genetik

Ailesi'ne ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarındaki arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde maddi manevi her türlü desteği sağlayan, sonsuz sevgi, sabır, anlayış ve destekleriyle haklarını asla ödeyemeyeceğim annem Zühal Torun ve babam Mehmet Hulusi Torun'a,

Herzaman yanımda olan moral kaynağım canım kardeşim Ahmet Çağlar Torun'a,

Tezim süresince sevgi ve desteğiyle hiçbir zaman beni yalnız bırakmayan, her daim ilerlememi destekleyen, emsalsiz sevgi, sabır, anlayışıyla varlığı mutluluk nedenim olan, nişanlım İhsan Özkan'a,

Başarımda katkısı bulunan herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY SAYFASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
TABLolar DİZİNİ	xviii
SİMGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Hemostaz	3
2.1.1. Pıhtılaşma Faktörleri	5
2.1.2. Primer ve Sekonder Hemostaz	6
2.2. Protein C	9
2.2.1. Protein C İnhibitörü (PCI)	12
2.2.2. Protein C İnhibitör Geni (PCI/ SERPINA5)	15
2.2.3. Pediatrik inme	15
2.2.4. Risk Faktörleri	16
2.3. Homosistein	21
2.3.1. Homosistein metabolizması	21
2.3.2. Homosistein Düzeyini Etkileyen Faktörler	23
2.3.3. Homosisteinüri	24
2.3.4. Systationin B Sentaz (CBS) Geni	26
2.4. Faktör V + Faktör VIII Kombine Eksikliği	30
2.4.1. ERGIC-53 (LMAN1) Geni	33
2.4.2. MCFD2 Geni	36
2.5. Fibrinojen Yapısı	38
2.5.1. Fibrinojen Eksikliklerinin Genetiği	40
2.6. Dev Trombosit Sendromu (Makrotrombositopeni)	42
2.6.1. MYH9 İle İlişkili Bozukluklar	43

2.6.2. MYH9 Geni	45
2.7. Glanzmann Trombasteni Sendromu.....	47
2.7.1. Glanzmann Trombasteni Genetiği.....	49
3. GEREKÇE VE AMAÇ.....	53
4. MOLEKÜLER TEKNİKLER	53
4.1. Çözelti ve Solüsyonlar	53
4.2. DNA Ekstraksiyonu.....	53
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	53
4.4. Tek İplikçikli Yapısal Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polymorphism).....	56
4.5. DNA Dizi Analizi.....	56
5. MATERYAL VE YÖNTEM	58
5.1. Materyal.....	58
5.1.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması	58
5.2. Yöntem.....	58
5.2.1. DNA İzolasyonu	58
5.2.2. DNA' nın Spektrofotometrik Analizi.....	60
5.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	60
5.2.3.1. PCI (SERPINA5) Geni Mutasyon Analizi	60
5.2.3.2. CBS Geni Mutasyon Analizi.....	62
5.2.3.3. ERGIC-53 Geni Mutasyon Analizi	63
5.2.3.4. MCFD2 Geni Mutasyon Analizi	64
5.2.3.5. FGB Geni Mutasyon Analizi	64
5.2.3.6. MYH9 Geni Mutasyon Analizi.....	65
5.2.3.7. GpIIB (ITGA2B) Geni Mutasyon Analizi.....	66
5.2.3.8. GpIIIA (ITGb3) Geni Mutasyon Analizi	68
5.3. Agaroz Jel Elektroforezi	68
5.4. Tek Zincirli Yapısal Polimorfizmi (SSCP) için Poliakrilamid Jel Hazırlanması	69
5.4.1. SSCP Jeli İçin Gümüş Boyama	70
5.5. PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu (Temizlenmesi)	71
5.6. DNA Dizi Analizi.....	72
6. ARAŞTIRMA BULGULARI	73
6.1. PCI Geni Mutasyon Analizi	73

6.2. CBS Geni Mutasyon Analizi	79
6.3. ERGIC-53 Geni Mutasyon Analizi	83
6.4. MYH9 Geni Mutasyon Analizi.....	88
6.5. FGB Geni Mutasyon Analizi.....	93
6.6. Glikoprotein IIB Geni (ITGA2B) Mutasyon Analizi.....	96
6.7. Glikoprotein IIIA Geni (ITGB3) Mutasyon Analizi.....	105
7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	107
7.1. Pediatrik inmeli hastalarda PCI Gen Taramasına İlişkin Analiz.....	107
7.2. Homosistinüri hastalarında CBS Gen Taramasına İlişkin Analiz.....	108
7.3. FVFXVIII Kombine Eksikliği Hastalarında ERGIC53 Gen Taramasına İlişkin Analiz	109
7.4. Makrotrombositopeni Hastalarında MYH9 Gen Taramasına İlişkin Analiz	110
7.5. Afibrinojenemi Hastalarında FGB Gen Taramasına İlişkin Analiz.....	111
7.6. Glanzmann Trombastenili hastalarda GpIIB Gen Taramasına İlişkin Analiz.....	112
7.7. Glanzmann Trombastenili hastalarda GpIIIA Gen Taramasına İlişkin Analiz.....	113
8. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	114
KAYNAKLAR.....	122
EKLER	133
EK1: A Novel Protein C Inhibitor gene mutation in pediatric stroke patients after bone marrow transplantation.....	134
EK2: A Novel 100 bp insertion in a patient with homocystinuria.....	138
EK3: Two new mutations at ERGIC-53 gene in a Turkish family.....	141
ÖZGEÇMİŞ	144

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Pıhtılaşma Faktörleri.....	5
Şekil 2.2. Pıhtılaşma Faktörlerinin Sınıflandırılması.....	5
Şekil 2.3. Koagülasyon Yolağı	8
Şekil 2.4. Protein C' nin Yapısı	9
Şekil 2.5. Aktive Protein C Rezistansı.....	11
Şekil 2.6. Homosistein metabolizmasında yeralan yollar	22
Şekil 2.7. CBS yapısı	26
Şekil 2.8. CBS geninde tanımlanan mutasyonlar.....	28
Şekil 2.9. FV ve FVIII Domain Yapısının Karşılaştırılması	31
Şekil 2.10. ERGIC-53 ün rol aldığı yolak.....	33
Şekil 2.11. ERGIC-53 domain yapısı	33
Şekil 2.12. ERGIC-53 geninde tanımlanan mutasyonlar	35
Şekil 2.13. MCFD2 geninde tanımlanan mutasyonlar	36
Şekil 2.14. Fibrinojenin yapısı	38
Şekil 2.15. Fibrinojen genlerinde tanımlanan mutasyonlar	40
Şekil 2.16. Trombositler	42
Şekil 2.17. Kasdışı miyozinin yapısı.....	45
Şekil 2.18. MYH9 geninde tanımlanan mutasyonlar.....	46
Şekil 2.19. Trombositlerin fonksiyonu	48
Şekil 2.20. GpIIB/IIIA reseptörlerinin yapısı ve fonksiyonu	50
Şekil 2.21. GpIIB geninde tanımlanan mutasyonlar	52
Şekil 2.22. GpIIIA geninde tanımlanan mutasyonlar	52
Şekil 6.1. PCI geni ekzon 2 PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	73
Şekil 6.2. PCI geninde SSCP tekniğiyle farklı bant profili veren hastanın belirlenmesi .	74
Şekil 6.3. PCI geninde hasta ve kontrolde DNA Dizi Analizi Karşılaştırması.....	75
Şekil 6.4. PCI geni cDNA'sında meydana gelen değişimin kodon düzeni ve aminoasit değişimi	75
Şekil 6.5. PCI geni transplantasyon öncesi/ sonrası DNA Dizi Analizi	77
Şekil 6.6. PCI geni ekzon 2 DNA Dizi Analizi görüntüleri.....	78
Şekil 6.7. PCI geni cDNA'sında meydana gelen değişimin kodon düzeni ve aminoasit değişimi	78
Şekil 6.8. CBS geni ekzon 4-6 PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	79

Şekil 6.9. CBS geni ekzon 4-6 'da sessiz mutasyona neden olan C>T değişiminin meydana geldiği nokta, DNA Dizi Analizi görüntüsü ve bunun proteine olan etkisi.....	80
Şekil 6.10. CBS geni ekzon 8' de 110bc' lik insersiyon agaroz jel görüntüsü ve hasta-kontrol DNA Dizi Analizi görüntüleri.....	80
Şekil 6.11. CBS geni ekzon 8 de 110 bc'lik insersiyonun başladığı noktanın gösterilmesi.....	81
Şekil 6.12. CBS geni ekzon 8 de 9122T>C değişiminin hasta- kontrolde DNA Dizi Analizi görüntüleri ve bu değişimin proteine olan etkisinin gösterilmesi.....	81
Şekil 6.13.. CBS geninde intron 11de meydana gelen 13175 G>A değişimin dizi üzerinde gösterimi ve DNA Dizi Analizi görüntüsü	82
Şekil 6.14. FV- FVIII değerlerini gösteren aile soyağacı ve aileye ait SSCP analiz görüntüsü	83
Şekil 6.15. Anneye ait DNA da ERGIC-53 geni ekzon 4 ün DNA Dizi Analizi görüntüsü	84
Şekil 6.16. Baba ve iki çocuğuna ait SSCP jel görüntüsü ve çocuğa ait DNA Dizi Analizi görüntüsü.....	84
Şekil 6.17. ERGIC-53 geni ekzon 9 da değişimin meydana geldiği noktanın Ensemble veritabanı kullanılarak gösterilmesi.....	85
Şekil 6.18. ERGIC-53 geni ekzon 9 da c.1088T>G değişiminin gösterilmesi, sağlıklı ve hasta bireye ait DNA Dizi Analizi görüntüleri	86
Şekil 6.19. ERGIC-53 geni intron 11 de 1570 C>T değişiminin gösterilmesi ve DNA dizi analizi görüntüsü.....	87
Şekil 6.20. ERGIC-53 geni intron 7 de 764-86 A>G değişimi ve DNA dizi analizi görüntüsü ve intronik bölgenin dizisi	87
Şekil 6.21. MYH9 geni ekzon 1'e ait %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	88
Şekil 6.22. MYH9 geni ekzon1'de hasta bireye ait DNA Dizi Analizi görüntüsü ve MYH9 cDNA'sında K64N değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi	89
Şekil 6.23. MYH9 geni 1.ekzonda hasta bireye ait DNA Dizi Analizi görüntüsü ve MYH9 cDNA'sında S96A değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi	90
Şekil 6.24. MYH9 geni Ekzon 25'e ait %2'lik agaroz jel görüntüsü	90

Şekil 6.25. MYH9 geni 25.ekzonda hasta bireye ait DNA Dizi Analizi görüntüsü ve MYH9 cDNA'sında S1195A değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi	91
Şekil 6.26. MYH9 geni Ekzon 26'a ait %2'lik agaroz jel görüntüsü	91
Şekil 6.27. MYH9 geni 26.ekzonda hasta bireye ait DNA Dizi Analizi görüntüsü ve MYH9 cDNA'sında A1144L değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi	92
Şekil 6.28. MYH9 geni 26.ekzonda hasta bireye ve sağlıklı kontrole ait DNA Dizi Analizi görüntüsü ve MYH9 cDNA'sında 3756 C>A (p.L1176M) + 3762 G>A (p.E1182K) değişimlerinin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi	93
Şekil 6.29. FGB geni Ekzon 4'e ait %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	93
Şekil 6.30. FGB geni ekzon 4 de L189P değişimini gösteren hasta ve sağlıklı kontrole ait DNA Dizi Analizi görüntüsü	94
Şekil 6.31. FGB geni ekzon 4 de 644 C>T değişimini gösteren hasta ve sağlıklı kontrole ait DNA Dizi Analizi görüntüsü.....	94
Şekil 6.32. FGB cDNA'sında L189P ve L196L değişimlerinin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi	95
Şekil 6.33. FGB cDNA'sında A136T değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ve aminoasit dizisi.....	96
Şekil 6.34. GpIIB geni Ekzon 4-1 ve Ekzon 4-2'e ait %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	96
Şekil 6.35. GpIIB geni ekzon 4 DNA Dizi Analizi görüntüleri , c.468 T>G p. V147G değişimi.....	97
Şekil 6.36. GpIIB geni ekzon 4 DNA Dizi Analizi görüntüleri , c.507G>T, p. G159S değişimi.....	98
Şekil 6.37. GpIIB geni Ekzon 13-1 ve Ekzon 13-2'e ait %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	99
Şekil 6.38. GpIIB geni ekzon 13 DNA Dizi Analizi görüntüleri , c.1291 G>T p. V420L değişimi	100
Şekil 6.39. GpIIB geni intronik bölgede meydana gelen T>G değişiminin DNA Dizi Analizi görüntüleri	101
Şekil 6.40. GpIIB geni ekzon 13 de meydana gelen P448T değişimine ait DNA Dizi Analizi görüntüleri.....	102
Şekil 6.41. GpIIB geni ekzon 13 de meydana gelen S415A değişimine ait DNA Dizi Analizi görüntüleri.....	103

Şekil 6.42. GpIIB geni ekzon 14 de 1921 A>G değişimine ait DNA Dizi Analizi görüntüleri... ..	104
Şekil 6.43. GpIIIA geni ekzon 5 de meydana gelen 680 A>C değişimine ait DNA Dizi Analizi görüntüsü.....	106

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Çalışılan nadir görülen hematolojik hastalıklar ve bu hastalıklara ait genler.....	2
Çizelge 2.1. Total plazma homosistein komponentleri ve yüzdeleri.....	23
Çizelge 2.2. Kalıtsal trombosit hastalıklarının sınıflandırılması	43
Çizelge 2.3. Makrotrombositopeninin laboratuvar ve klinik özellikleri	44
Çizelge 5.1. PCI genine ait 5 ekzonun amplifikasyonu için kullanılan primer setleri	61
Çizelge 5.2. CBS genine ait 18 ekzonun amplifikasyonu için kullanılan primer setleri....	62
Çizelge 5.3. ERGIC-53 genine ait 13 ekzonun amplifikasyonu için kullanılan primer setleri	63
Çizelge 5.4. MCFD2 genine ait 5 ekzonun amplifikasyonu için kullanılan primer setleri	64
Çizelge 5.5. FGB genine ait 8 ekzonun amplifikasyonu için kullanılan primer setleri.....	65
Çizelge 5.6. FGB genine ait 8 ekzonun amplifikasyonu için kullanılan primer setleri.....	65
Çizelge 5.7. GpIIB genine ait 35 bölgenin amplifikasyonu için kullanılan primer setleri	67
Çizelge 5.8. GpIIIA genine ait 4 ekzonun amplifikasyonu için kullanılan primer setleri..	68
Çizelge 6.1. PCI geninin Homo sapiens'te 188. pozisyonunda yer alan Serin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi	76
Çizelge 6.2. MYH9 geninin Homo sapiens'te 64. Pozisyonunda yer alan Lizin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi	89
Çizelge 6.3. FGB geninin Homo sapiens'te 189. pozisyonunda yer alan Lösin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi	95
Çizelge 6.4. GpIIB geninin Homo sapiens'te 468. pozisyonunda yer alan Valin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi	99
Çizelge 6.5. GpIIB geninin Homo sapiens'te 420. pozisyonunda yer alan Valin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi	101
Çizelge 6.6. GpIIB geninin Homo sapiens'te 415. pozisyonunda yer alan Serin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi	103
Çizelge 6.7. GpIIB geninin Homo sapiens'te 646. pozisyonunda yer alan Treonin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi	105
Çizelge 8.1. Afibrinojenemi hastalarında FGB geninde bu çalışmada tanımlanan mutasyonlar	119

Çizelge 8.2. FV+FVIII kombine eksikliği olan hastalarda ERGIC-53 geninde bu çalışmada tanımlanan mutasyonlar	120
Çizelge 8.3. Makrotrombositopeni hastalarında MYH9 geninde bu çalışmada tanımlanan mutasyonlar	120
Çizelge 8.4. GT hastalarında GpIIB geninde bu çalışmada tanımlanan mutasyonlar	120

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. İnmede risk faktörlerinin sınıflandırılması	16
Tablo 7.1. Pediatrik inme hasta ve sağlıklı kontrol grubunda p ve OR değeri	107
Tablo 7.2. Homosistinüri hasta ve sağlıklı kontrol grubunda p ve OR değeri.....	108
Tablo 7.3. FV-FVIII kombine eksikliği olan hasta ve sağlıklı kontrol grubunda p ve OR değeri.....	109
Tablo 7.4. Makrotrombositopeni olan hasta ve sağlıklı kontrol grubunda p ve OR değeri	110
Tablo 7.5. Afibrinojenemi olan hasta ve sağlıklı kontrol grubunda p ve OR değeri	111
Tablo 7.6. Glanzmann trombasteni sendromlu hasta ve sağlıklı kontrol grubunda p ve OR değeri.....	112
Tablo 7.7. Glanzmann trombasteni sendromlu hasta ve sağlıklı kontrol grubunda GpIIIA geni için p ve OR değeri	113

SİMGELER DİZİNİ

A	: Adenin bazı
Ala	: Alanin
Arg	: Arjinin
Asn	: Asparajin
Asp	: Aspartik Asit
ATP	: Adenozintrifosfat
Bç	: Baz çifti
C	: Sitozin bazı
°C	: Santigrat derece
Ca ⁺⁺	: Kalsiyum
dATP	: Deoksiadenintrifosfat
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
g	: Gram
G	: Guanin bazı
G	: Glisin
Glu	: Glutamik Asit
Gly	: Glisin
Gp	:Glikoprotein
HCl	: Hidroklorik asit
HGMD	: Human Gene Mutation Database (İnsan Genom Mutasyon Veritabanı)
His	: Histidin
Ile	: İzolösin
kb	: Kilobaz
KCl	: Potasyum klorür
kDa	: Kilo Dalton
L	: Lizin
M	: Molar
Met	: Metiyonin
mg	: Miligram

Mg ⁺⁺	: Magnezyum
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikromol
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	: Asitlik-Bazlık Derecesi
pmol	: Pikomol
Pro	: Prolin
RBC	: Kırmızı Kan Hücresi
RNA	: Ribonükleik asit
Rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
Ser	: Serin
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
T	: Timin bazı
TAE	: Tris-Asetik asit-EDTA
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TE	: Tris-EDTA
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin
Thr	: Treonin
X	: Dur kodonu
V	: Volt
Val	: Valin
W	: Triptofan

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tromboz, Virchow tiradı olarak bilinen damar duvarı değişiklikleri, kan akımındaki bozukluklar ve kan yapısındaki değişiklikler sonucu oluşmaktadır. Tromboza eğilim oluşturan durumların çoğu edinseldir. Kalıtsal tromboz nedenlerine ise nadiren rastlanır. Toplumlar arasında farklılık göstermekle birlikte tromboz görülme sıklığı yaklaşık 1/1000'dir. Nadir görülen kalıtsal trombozlar kapsamında; bazı koagülasyon faktörleri (fibrinojen, faktör VIII, IX, XI, Trombinle aktive olabilen fibrinoliz inhibitörü-TAFI), afibrinojenemi, disfibrinojenemi, plazminojen aktivatör inhibitör-1, hiperhomosistenemi sayılabilir.

Nadir görülen faktör eksiklikleri otozomal resesif kalıtılan, 500 binde bir ile 2 milyonda bir sıklıklarında karşılaşılan pıhtılaşma faktörü eksikliklerini tanımlar. Fibrinojen, FII, FV, FV+FVIII, FVII, FX, FXI ve FXIII tüm kalıtsal faktör eksikliklerinin % 3-5'ini oluştururlar. Akraba evliliklerinin de yaygın olduğu ülkemizde bu nadir hastalıkların görülme sıklığı giderek artmaktadır.

Klinik olarak nadir görülen hematolojik hastalıklar kapsamında yeralan pediatrik inme, homosistinüri, FV- FVIII kombine eksikliği, afibrinojenemi, makrotrombositopeni, Glanzmann trombastenisi tanısı almış hastalarla yapılan çalışmada hastalıklarla ilişkili olan Protein C Inhibitor geni (PCI), Systationin Beta Sentaz geni (CBS), Endoplazmik Retikulum Golgi Intermediate Compartment-53 (LMAN1/ERGIC-53) geni ve Multipl Koagülasyon Faktör Eksikliği 2 (MCFD2) geni, Miyozin Ağır Zincir-9 (MYH9) geni, Fibrinojen Beta Zincir (FGB) geni, Glikoprotein IIB geni (ITGA2B / GpIIB) ve Glikoprotein IIIA (ITGB3/ GpIIIA) genleri taranarak Türk popülasyonunda nadir görülen hastalıklarda sık görülen mutasyonların ortaya konması ve daha sonraki çalışmalarda mutasyon analizi yapılırken bu değişiklikler öncelikli olarak taranarak hem zaman hem de maliyet açısından fayda sağlanması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda belirlenen hastalıklarda ilgili genlerin taraması yapılmıştır. (Çizelge 1.1)

Çizelge 1.1. Çalışılan nadir görülen hematolojik hastalıklar ve bu hastalıklara ait genler

Gen	Hastalık
Protein C İnhibitör Geni (PCI)	Pediyatrik Stroke (İnme)
Sistatyonin β Sentaz Geni (CBS)	Homosistinüri
Endoplazmik Retikulum- Golgi intermediate compartment (ERGIC-53) geni / MCFD-2 Geni	FV-FVIII Kombine Eksikliği
Fibrinojen Beta Geni (FBG)	Afibrinojenemi
Myosin Heavy Chain (MYH9)	Dev trombositopeni
Glikoprotein IIbgeni (ITGA2B) Glikoprotein IIIa (ITG3B)Geni	Glanzmann Trombasteni

PCI, CBS, MYH9, FBG, ERGIC-53, MCFD2, GpIIb ve GPIIIa genlerinde görülen mutasyonların tanımlanması, sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere bu mutasyonlar için bir tanı kitinin oluşturulması tezin multidisipliner bir alan olan biyoteknoloji açısından da önemini belirtmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. HEMOSTAZ

Kanın damar içerisinde sağlıklı bir şekilde akması hemostatik sistem tarafından sağlanır. Normal hemostaz, damar duvarındaki yaralanmayı takiben pıhtı oluşumu ve doku tamiri ile sonuçlanan süreçleri içerir. Damar endotel hücreleri, trombositler, von Willebrand faktör (vWF), doku faktörü, pıhtılaşma proteinleri, fibrinolitik sistem, antikoagülan proteinler hemostaz sisteminin elemanlarını oluştururlar (1). Bir damar hasarı olduğunda çözünür olmayan trombosit ve fibrin tıkaçı oluşarak kan kaybı önlenir, ardından da damar bütünlüğü tekrar sağlanır. Olaylar damar spazmı, trombosit tıkaçının oluşumu, kanın koagülasyonu sonucu kan pıhtısının oluşumu ve fibröz dokunun pıhtı içine doğru büyümesiyle damardaki hasarın kalıcı olarak kapatılması şeklinde dört aşamada gerçekleşir. Hemostazı sağlamak için pıhtılaşma sistemi, doğal antikoagülanlar ve fibrinolitik sistem denge halinde olmalıdır. Bu dengenin bozulması anormal tromboz veya kanamaya neden olabilir. Hemostaz mekanizması damar bütünlüğü, trombositler ve koagülasyon mekanizması olmak üzere üç ayrı bölümden oluşan bir fonksiyondur. Kanamanın durması için bu üç ayrı bölümün de normal fonksiyon göstermesi gerekir. Bu fonksiyonlar tek tek ele alınacak olursa;

a.Damar Bütünlüğü: Damarların çeperini çevreleyen endotel hücreleri, hemostaz-pıhtılaşma sisteminin çeşitli fonksiyonlarını düzenlemektedirler. Bir yandan antitrombosit, antikoagülan ve diğer fibrinolitik özelliklere sahip iken diğer yandan pıhtılaşmayı başlatıcı fonksiyonları da vardır. Kan damarında bir travma meydana geldiğinde kısa bir süre içinde refleks olarak oluşan vazokonstriksiyon o damarda kan akımının yavaşlamasına neden olmaktadır. Oluşan bu vazokonstriksiyondan, vazokonstriktör bir madde olan Tromboksan A₂'i serbestleştiren trombositler sorumludur. Süreç içerisinde trombosit tıkaçı ve kan pıhtılaşması gerçekleşmektedir.. Vazokonstriksiyon küçük kan damarlarında kanamayı durdurmak için etkili bir mekanizma olmasına rağmen daha geniş damarlarda kanama durumunda yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle trombosit yapışması, kümelenmesi ve trombus oluşumu gibi ek mekanizmalara ihtiyaç duyulmaktadır (2).

b. Trombositler: Primer hemostaz, kapiler kan kaybını durdurmada esas önceliğe sahip olup önceliği vasküler endotel ve trombositlerdir. Megakaryositler kemik iliğinde ya da kana geçtikten bir süre sonra özellikle pulmoner kapillerden geçmeye çalışırken parçalanarak trombositleri oluştururlar. Bunlar yuvarlak ya da oval, 2–4 mikron çapında

küçük disk şeklinde hücrelerdir. Trombositlerin kanda normal konstrasyonları 150.000-400.000 mm³/L' dir. Yapılan araştırmalarda uygun boya ile boyanmış olan trombositlerin üç tip granülden oluştuğu ortaya konulmuştur: Alfa granülünde trombosit kökenli bir büyüme faktörü (PDGF), fibrinojen, fibronektin, von Willebrand faktörü (vWF) ve diğer pıhtılaşma faktörleri yer alırken ikinci Ca⁺⁺, adenin nükleotidleri (adenozin difosfat, adenozin trifosfat), iyonize kalsiyum, histamin, serotonin (5- hidroksitriptamin) ve epinefrin'in metabolizma dışı birikiminin depolama yerini oluşturmaktadırlar. Üçüncü tip granül ise lizozomal granül olup hidrolitik enzimler taşımaktadır (3). Trombosit çevreleyen hücre zarı ise kollajen ve vWF'e bağlanıp trombositin subendotele yapışmasını sağlayan glikoproteinleri içerir ki trombosit yüzeyinde en çok bulunan glikoproteinler bu çalışmanın konusu içerisinde yeralan integrin ailesinin üyesi olan glikoprotein IIB ve IIIA'dır. Heterodimer olan bu iki glikoprotein fibrinojen, vWF ve fibronektin gibi adhesiv proteinler için reseptör görevi yapmaktadır (4).

c. Koagülasyon Sistemi: Koagülasyon; kanda yeralan birçok protein ile koagülasyon faktörlerinin etkileşimleri sonucu fibrin oluşumu ile sonuçlanan bir mekanizmadır. Bu reaksiyona katılan proteinler fonksiyonel olarak zimojenler (proenzimler), kofaktörler, inhibitörler ve fibrinojen olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır.

2.1.1. PIHTILAŞMA FAKTÖRLERİ

Faktör I	Fibrinojen
Faktör II	Protrombin
Faktör III	Doku faktörü, doku tromboplastini
Faktör IV	Kalsiyum
Faktör V	Proakselerin
Faktör VII	Prokonvertin
Faktör VIII	Antihemofilik globulin, antihemofilik faktör A
Faktör IX	Christmas faktörü, antihemofilik faktör B
Faktör X	Stuart-prower faktörü
Faktör XI	Plazma tromboplastin antesedan
Faktör XII	Hageman faktörü
Faktör XIII	Fibrini stabilize eden faktör
Prekallikrein (Fletcher faktörü)	
Yüksek molekül ağırlıklı kininojen (Fitzgerald faktörü)	

Şekil 2.1. Pıhtılaşma Faktörleri

Pıhtılaşma faktörleri dört grup altında sınıflandırılabilir:

A- K vitaminine bağımlı faktörler

1. Faktör II (Protrombin)
2. Faktör VII
3. Faktör IX
4. Faktör X
5. Protein C
6. Protein S

B. Trombine Duyarlı Faktörler

1. Faktör I (Fibrinojen)
2. Faktör V
3. Faktör VIII
4. Faktör XIII

C. Kontakt Faktörleri

1. Faktör XII
2. Faktör XI
3. Yüksek Molekül Ağırlıklı Kininojenler (HMWK)
4. Prekallikrein

D. Fosfolipidler ve Kalsiyum İyonları

E. Koagülasyon İnhibitörleri

Şekil 2.2. Pıhtılaşma Faktörlerinin Sınıflandırılması

2.1.2. PRİMER VE SEKONDER HEMOSTAZ

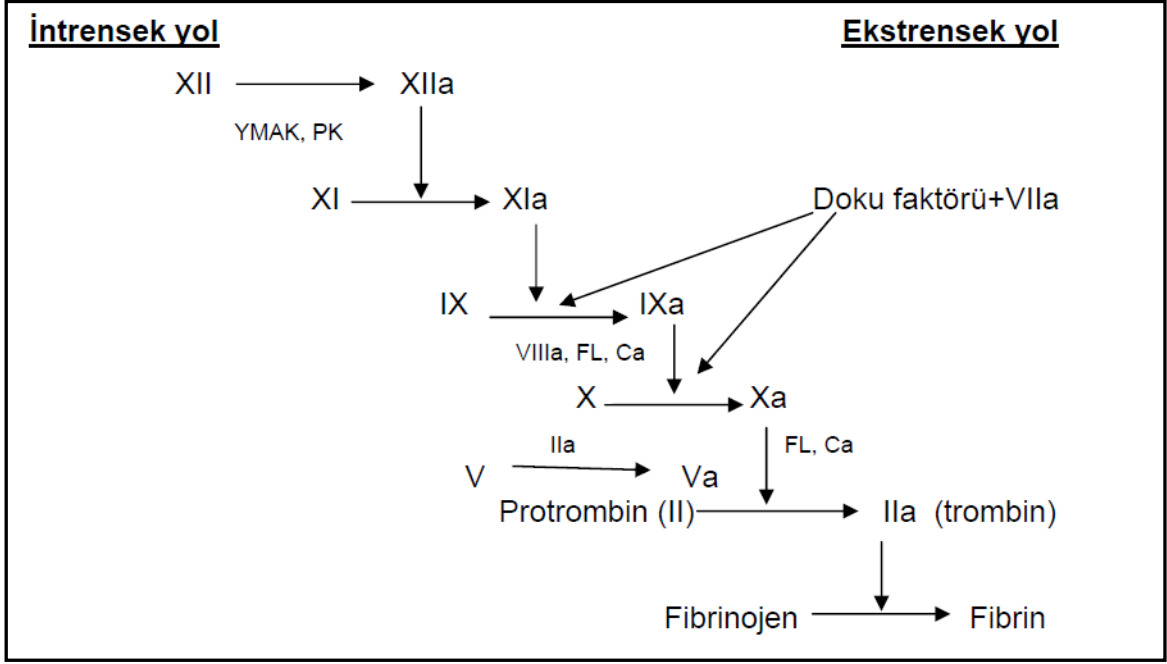
Primer hemostaz, trombositlerin ve endotel hücrelerinin aktivasyonu ile gerçekleşen bir süreçtir. Normal koşullar altında trombositler diğer trombositlerle ya da damar endotelini ile etkileşmeden serbestçe kan damarında dolaşırlar. Endotelde zedelenme olması durumunda pıhtı oluşumuna neden olan bir olaylar zinciri tetiklenir. Bir damarın zarara uğramasıyla birlikte trombositler, subendotelial kollajen, kapiller bazal membranı, fibroblastlar ve düz kas hücreleri gibi damar duvarının birçok elemanı ile temas ederler. Bunların hepsi trombosit yapışmasına neden olmakla birlikte, içerisinde en kuvvetli uyarıcı kollajendir. Kollajenle temas eden trombositler adhezyon, sekresyon ve agregasyon olmak üzere bir dizi reaksiyona uğrarlar. Bunların tümüne birden trombosit aktivasyonu adı verilir (5,6). Trombositlerin hasar sonucu kollajene yapışması ya doğrudan yüzeylerinde yer alan glikoprotein Ia/IIa reseptörü aracılığı ile ya da glikoprotein Ib-IX/V kompleksi ile megakaryositlerden sentezlenen bir protein olan von Willebrand faktörü (vWF)'e bağlanmaları ile olur. Trombositlerin subendotelial kollajene yapışmalarının hemen ardından Adenozindifosfat (ADP), fibrinojen, fibronektin, TXA₂ ve kalsiyum (Ca⁺⁺) platelet faktör-4, transforming growth faktör-β salınır. Bunlar içerisinde en önemlisi ADP salınımıdır çünkü ADP, trombosit kümeleşmesini sağlar ve aynı zamanda diğer trombositlerden ADP salgılanmasını artırır. ADP'nin salgılanıp reseptörüne bağlanmasını kalsiyumun hızla sitoplazmaya akması, hücre içi kalsiyum depolarının hareketi, şekil değişikliği, adenil siklazın inhibisyonu, inozitol trifosfat (IP₃) oluşumunun uyarılması, glikoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) ifadesi, fosfolipaz A₂'nin uyarılması, trombosit içeriklerinin salgılanması takip etmektedir (4). Böylece giderek büyüyen aktif bir trombosit kümesinin oluşmasına yol açarak, kendi kendini yineleyen bir mekanizma kurulmuş olur. Başlangıçta trombosit kümeleşmesi geri dönebilir niteliktedir, dolayısıyla damar duvarındaki hasar geçici bir hemostatik bir tıkaç ile kapatılır. Eğer endotel hasarı küçük ise oluşan bu trombosit tıkaçı kanamayı durdurmakta yeterli olabilir ancak daha büyük yaralanmalarda koagülasyon proteinlerinin de aktive olduğu sekonder hemostazı başlatması gerekir (7).

Sekonder Hemostaz: Sekonder hemostaz koagülasyon faktörlerinin aktive olmasıyla başlayıp fibrin oluşumuyla sonuçlanan bir dögüdür. Kanın pıhtılaşmasındaki esas olay, çözünebilir plazma proteini olan fibrinojenin kısmen çözünmeyen iplikçikler halindeki fibrin proteinine dönüşmesidir. Pıhtılaşma mekanizması, intrinsik, ekstrinsik ve ortak yolak olmak üzere üç sisteme bağlı olarak gelişir (8).

Ekstresek Yolak: Hızlı ve erken aktive olan bu basamak birçok hücre tipinin integral membran proteini olan doku faktörünün (TF) aktivasyonu ile başlamaktadır. Doku faktörü doğrudan Faktör VII'e bağlanmakta ve Ca^{++} iyonlarının varlığında TF hızla FVII'i FVIIa şeklinde aktive etmektedir. FVIIa-TF kompleksi, FIX ve FX' un FIXa ve FXa'ya dönüşümünü tetiklemektedir. Aktive olmuş trombositlerin yüzeyi negatif yüklü fosfolipidlerce zengindir. Pıhtılaşma sistemi faktörleri ile birleşerek reaksiyonların devamını sağlamaktadırlar. FXa, aktive FV, Ca^{++} ve fosfolipid (protrombinaz kompleksi) varlığında protrombin trombin'e dönüştürülmektedir. Trombin ise fibrinojenin fibrine dönüşmesini sağlamaktadır. Trombin pıhtılaşma sisteminin en önemli enzimidir (9,10).

İntrensek Yolak: İntrensek yola katılan faktörlerin hepsi dolaşımda inaktif olarak mevcuttur. Bu yolda en önemli rolü Faktör XII oynamaktadır. Faktör XII'nin endotel yüzeyinde, doku bütünlüğü bozulmuş bölgeye temasıyla aktivasyon başlar. Bu aktivasyonda prekallikrein ve yüksek molekül ağırlıklı kininojenler (YMAK) önemli rol oynar, ve kininojenler Faktör XII aktif serin proteaz formu olan Faktör XIIa'ya dönüştürür. Faktör XIIa ise Faktör XI' yi aktif şekli olan FXIa'ya ve prekallikreinin aktif şekli olan kallikreine dönüştürür. Ayrıca FXIa, YMAK kofaktörlüğünde FIX 'i FIXa' ya aktifleştirmektedir. FIXa ise FVIII eşliğinde FX'u FXa şeklinde aktifleştirir (10,11)

Ortak Yol: Pıhtılaşma yolunun ortak kısmında hem intrensek hem de ekstresek yolakda aktifleşebilen Faktör Xa, Faktör Va ile birlikte Ca^{++} ve fosfolipidler varlığında protrombini (Faktör II) trombine (Faktör IIa) dönüştürür. Güçlü bir antikoagülan olan ve profibrinolitik olan Protein C'nin aktivasyonunu sağlayan trombin fibrinojeni fibrine çevirir ve aynı zamanda da fibrin stabilize edici Faktör XIII'ü aktif Faktör XIIIa' ya dönüştürerek fibrin pıhtısının stabil olmasını sağlar (12,13).

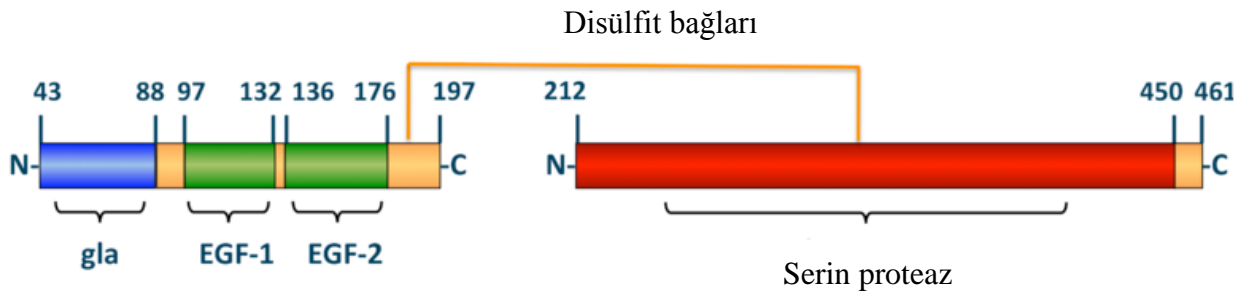


Şekil 2.3. Koagülasyon Yolağı

Koagülasyon kaskadı aktivatör ve inhibitörlerle çok sıkı denetlenen bir sistemdir. Bu reaksiyonlar devam ederken, pıhtılaşmayı sadece gerekli bölgeye sınırlamak için doğal koagülasyon inhibitörleri devreye girer. Antitrombin, protein C ve protein S değişik koagülasyon faktörlerinin fizyolojik inhibitörleridir. Diğer yandan fibrinolitik sistem global hemostaz sürecinde en az pıhtılaşma sistemi kadar önemli diğer bir sistemdir. Bu sistemde fibrin bir serin proteaz olan plazmin tarafından proteolitik olarak parçalanır. Doku sıvılarında ve kanda bulunan beta globulin yapısındaki bir proenzim olan plazminojen, bir serin proteaz olan plazmin'e dönüştüğünde fibrinin ilk degradasyonu sağlanır. Fibrin, plazminojenin aktivasyonu için bir kofaktör olarak rol oynarken, plazmin için de substrat görevi görür (14). Fibrinolitik sistemin, major aktivasyonu endotelial hücrelerden salınan doku plazminojen aktivatörü (tPA) ile olmaktadır. tPA; karaciğerde sentezlenen bir serin proteazdır ve fibrine bağlanır. Bu bağlanma plazminojenin plazmine çevrilme kapasitesini artırmaktadır (15).

2.2. PROTEIN C

Pıhtılaşma sisteminin doğal bir inhibitörü olan, Faktör XIV olarak da bilinen Protein C (PC)'nin antikoagülan etkisi ilk kez 1960'da Seegers ve ekibinden olan Orhan Ulutin tarafından tanımlanmıştır (16). Protein C ilk kez 1976'da Johan Stenfelo tarafından sıgır plazmasından izole edilmiş ve Vitamin K'ya bağımlı 62kD molekül ağırlıklı bir glikoprotein olduğu ortaya konulmuştur (17). Protein C yapı olarak bir tane gama-karboksilglutamik asit rezidüsünce (Gla) zengin domain, iki tane epidermal büyüme faktör (EGF) domaini, serin proteaz (SP) domaini ve kısa bir aktivasyon peptidinden oluşmaktadır. Fonksiyonu ise şu şekilde olmaktadır: Gla domainindeki glutamik asit rezidülerinin vitamin K bağımlı posttranslasyonel karboksilasyonunun sonucu olarak Gla rezidüleri ortaya çıkmıştır. Gla rezidüleri kalsiyumu (Ca^{++})'u bağlar ve domain katlanır. PC aktivasyonu çeşitli etkileşimlerle sağlandığında PC'nin aktivasyon peptidi serbest bırakılır ve serin proteaz domainin aktif konformasyonuna dönüştürülür (18,19).

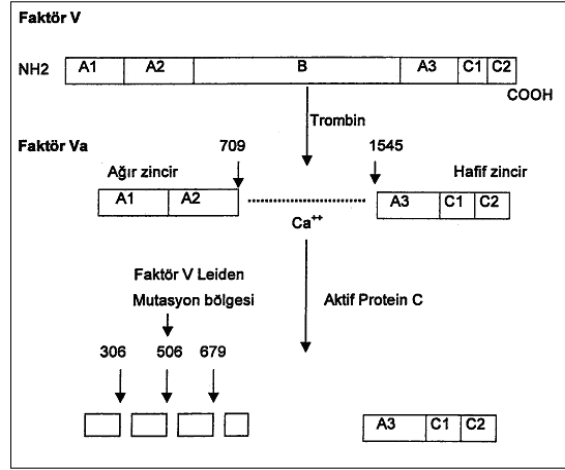


Şekil 2.4. Protein C' nin Yapısı

Protein C, trombus formasyonunun kontrolü ve düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. Karaciğerde sentezlenir ve yarı ömrü 6-8 saattir. PC, kanda bir antikoagülant serin proteaza zimojen olarak bulunmakta ve trombin-trombomodulin kompleksi ile endotel hücrelerin yüzeyinde aktif forma dönüşmektedir (Aktive Protein C (APC)). Trombin trombomoduline bağlandığında oluşan kompleks serbest olarak bulunan trombinden 1000 kat daha hızlı protein C' i aktive eder (20) . Aktive olmuş protein C'nin temel kofaktörü 69 kDa molekül ağırlıklı Vitamin K'a bağımlı bir glikoprotein olan Protein S (PS) dir. Karaciğerde sentezlenen ve yarıömrü 42 saat olan PS yapı olarak bir N terminal fosfolipid bağlayan Gla domaini, dört EGF-like domaini, bir trombin duyarlı bölge (TSR) ve iki laminin G tipi domainlerinden (Lam G) oluşmaktadır. Negatif yüklü fosfolipit membranlar

için yüksek affiniteye sahip olan PS, APC ile kompleks oluşturmaktadır. APC, pıhtılaşmayı önleyici etkisini kofaktörü ile birlikte negatif yüklü fosfolipit membranın yüzeyinde yer alan koagülasyon faktörleri FVa ve FVIIIa'ı inaktive ederek gösterir. PC, pıhtılaşma sisteminin kontrolünü bu şekilde sağlamaktadır. FVa protrombinaz, FVIIIa tenaz komplekslerindeki kofaktörlerdir. Bu iki faktöre trombin formasyonunun amplifikasyonu için gerek duyulmaktadır ve bu faktörler fibrin oluşumunu regüle etmektedirler. APC, FVa ve FVIIIa'nın proteolitik degradasyonu ile koagülasyon basamaklarının sıralı aktivasyon ve amplifikasyonlarını sınırlandırmaktadır (21). APC tarafından FVIIIa'nın etkin degradasyonu yalnızca protein S'ye ihtiyaç duymamakta; aynı zamanda hem antikoagülant hem de prokoagülant potansiyelli bir protein olan bozulmamış FV'i de gerektirmektedir (22).

PC sistemi fizyolojik olarak da büyük bir öneme sahiptir. Sistemi etkileyen genetik bozukluklar venöz trombozun en büyük riskini oluşturmaktadır. Aktive protein C direnci, venöz tromboz ile ilişkili en yaygın kalıtsal koagülasyon defektidir. Bu moleküler defekt derin ven trombozlu hastaların % 20- 40'ında bulunmuştur. Aktive Protein C direnci ilk kez 1993 yılında tanımlanmıştır (23). Aktive protein C, faktör V'i 506. aminoasit lokalizasyonundan böler. Beyaz ırkta bu lokalizasyonda % 90 ihtimalle arjinin aminoasidi, % 10 ihtimalle de glutamin aminoasidi bulunmaktadır. Glutamin bulunduğu faktör V aktive protein C'nin parçalayıcı etkisine 10 kat daha dirençlidir. İşte 506. aminoasit lokalizasyonunda arjinin yerine glutamin aminoasidinin bulunması durumundaki faktör V'e faktör V Leiden (FVL), faktör V Leiden'in yol açtığı pıhtılaşma fenotipine ise Aktive Protein C Direnci denilmektedir (24). Bu kişilerde hemostatik denge protrombotik sistem lehine bozulmuş olup, tromboz gelişimine yatkınlık ortaya çıkmıştır. Ülkemizde görülme sıklığı % 8 düzeyindedir. Homozigot FV Leiden varlığı tromboz riskini 80 kat arttırırken heterozigot formu sadece 3-7 kat artışa neden olmaktadır. FV Leiden dışında hamilelik, oral kontraseptif kullanımı, artmış FVIII düzeyinin aktive protein C rezistansı yarattığı bilinmektedir (25).



Şekil 2.5. Aktive Protein C Rezistansı

Homozigot protein C eksikliği purpura fulminans ile kendini gösterir ve tek genetik faktör varlığının klinik önemi yoktur. Heterozigot protein C eksikliği ise otozomal dominant geçişli olup sağlıklı toplumda 1/200- 1/500 sıklığında bulunmaktadır. İmmünolojik ve fonksiyonel yöntemlere göre iki tip protein C eksikliği tanımlanmıştır (26)

Tip I: En sık görülen protein C eksikliği olup bu tip hastaların serumunda protein C konsantrasyonu normalin yarısı kadar ölçülmektedir. Bu tip eksiklik hastalarda genetik olarak missense (yanlış okuma), nonsense (okuyamama) mutasyonları, delesyon ve insersiyonlardan kaynaklanmaktadır.

Tip II: Bu tip eksiklikte serum protein C seviyesi normaldir fakat protein C fonksiyonel yönden aktif değildir (27).

Akar ve ark.'larının 2005 yılında yaptığı bir çalışmada venöz tromboembolisi olan hastaların %2-5' inde protein C eksikliği saptanmıştır. Bu sıklığın genç ve tekrarlayan vakalarda %10-15' e kadar çıktığı ortaya konulmuştur. Kalıtsal PC eksikliğinin sıklığı trombozlu vakalarda %3, populasyonun genelinde ise % 0,2 dir (28).

Edinsel Protein C eksikliğinde ise karaciğer hastalıkları, şiddetli enfeksiyonlar (meningokoksemi), septik şok, ameliyat sonrası dönem, siklofosamid, metotreksat, 5-flourourasil ve L-asparajinaz tedavisi başlıca etkili olan nedenlerdir.

İlk kez endotel hücrelerinden elde edilen ve klonlanan Endotelial Protein C Reseptörü (EPCR) ise protein C ve aktive protein C'e yüksek bağlanma affinitesi gösterir. Trombin-trombomodülün kompleksi varlığında Protein C, EPCR'e bağlanarak aktif hale geçer. APC

antikoagülan yolu, protein S, kardiolipin ,glukozilseramid gibi çeşitli faktörler, yüksek yoğunluklu lipoproteinler varlığında FVa ve FVIIIa pıhtılaşma faktörlerinin proteolitik aktivasyonunu sağlar. Endotel üzerinden APC'ye bağlı yolların çalışması için EPCR gerekmektedir. EPCR, dendritik hücreler ve lökositlerde, akciğer pnömositlerinde, nötrofillerde, kalp ve akciğerdeki venler ve arterlerin endotel hücrelerinde eksprese edilmektedir (29) .

2.2.1. Protein C İnhibitörü (PCI)

Protein C inhibitörü (PCI), serin proteaz ailesinden (SERPINA5) α 1 proteaz inhibitör prototipinde bir plazma glikoproteinidir. İlk olarak insan plazmasında aktive protein C inhibitörü olarak daha sonra ise koagülasyon ve fibrinolizisin inhibitörü olarak tanımlanmıştır. PCI, idrardan sekrete olur ve ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (uPA) ile kompleks oluşturur. Bu nedenle plazminojen aktivatör inhibitörü 3 (PAI-3) olarak da bilinir (30). PCI' nin heparine bağlanma özelliği vardır ve diğer proteaz inhibitörleri antitrombin (ATIII) ve heparin kofaktör II (HCII) gibi heparin bağlayan serpinler sınıfında yer alır. Heparin negatif yüklü glikozaminoglikan olup, mast hücreleri ve az miktardaki bazofiller tarafından salgılanmaktadır. Antitrombin III ile kompleks oluşturarak koagülasyon kaskadından trombin, FXIIIa, FXIa, FXa ve FIXa'ı uzaklaştırma görevi vardır (31). PCI'nin bazik rezidüleri ile ilişki içerisindedir. APC inhibisyonu 5-10 u/ml düzeyindeki heparinle sağlanabilmektedir. PCI'nin tromboz ve fibrinoliziste, fertilizasyonun düzenlenmesinde, doku rejenerasyonunda, vasküler permeabilitede, tümör gelişimi, invazyon, metastaz ve anjiyogenezin düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir (32).

Protein C inhibitörünün Dokularda Ekspresyonu : İnsanlarda PCI konsantrasyonu plazmada 80-100 nM konsantrasyonunda bulunmaktadır ve karaciğerden köken aldığı düşünülmektedir. Bununla birlikte kadın ve erkeklerde üreme organları, deri, pankreas ve böbrekte de sentezlendiği bilinmektedir (33). Kemirgenlerde PCI nün büyük oranda üreme organlarında eksprese olduğu bilinirken yapılan çalışmalar fare gelişimi sırasında PCI ekspresyon paternlerini de ortaya koymuştur. Buna göre deride, beyin ventriküllerinde, kalpte, ürogenital sistemde, iskelet kaslarında ve kıkırdaklarda yaygın şekilde PCI ekspresyonu olduğu saptanmıştır (34). Akciğer gelişiminde PCI ekspresyonunun görülmesi akla PCI'nin akciğer morfogenez ve anjiyogenezinde rol oynayabileceğini getirmektedir.

PCI'nın, hepatosit büyüme faktörünün aktivatörü üzerinde inhibitör etkisi yaparak doku büyüme ve rejenerasyonunda rol oynadığının gösterilmesi büyüme sinyalizasyonu gibi hücrenel süreçlerde PCI'nın önemini ortaya koymaktadır (35).

Tromboz ve Hemostazda PCI: Protein C, trombinin vasküler endotele bağlanması ile aktive protein C (APC) haline dönüşür. Faktör V geninde nokta mutasyon varlığında aktive protein C direnci (APCR) ortaya çıkar. Mutasyon sonucu ortaya çıkan anormal Faktör V, faktör V Leiden adını alır. Aktive protein C direnci venöz trombozla ilişkili en yaygın kalıtsal koagülasyon defektidir. Bu moleküler defekt derin ven trombozlu hastaların %20-40'ında bulunmuştur.

Derin ven trombozlu, pulmoner embolili hastalarda APC ve PCI kompleksi ile birlikte α -1 antitripsin bulunduğu saptanmış, bu da patolojik koşullar altında protein C sisteminin regülasyonunun PCI tarafından olduğunu göstermiştir (36).

PCI; koagülasyon enzimlerinin inhibisyonunda antikoagülant, trombin-trombomodulin tarafından aktive olan APC-Protein C'nin inhibitörü olarak ve ürokinazın inhibisyonunda antifibrinolitik görevde rol almaktadır.

Fertilizasyonda PCI : In vivo ve in vitro fertilizasyon çalışmaları PCI knock-out (genleri susturulmuş) farelerin spermelerinin normal dişi farelerin oositlerine bağlanmadığını ve fertilizasyonun gerçekleşmediğini göstermiştir. PCI knock-out farelerde yapılan histolojik analizler sperm hücrelerinin malformasyona uğradığını, normal olarak gerçekleşmeyen spermatogenezin erkek ürogenital sisteminde bulunan sertoli hücrelerinin zarar görmesiyle beklenmeyen proteolitik aktivite ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. PCI, seminal plazmada bulunan bir çok enzimi inhibe etmektedir ama yine de fertilizasyonun spesifik aşamalarında rolü vardır.

Teoride, insan fertilizasyonu ile PCI genindeki mutasyonların bağlantılı olduğu düşünülebilir (37). Ancak Gianotten ve arkadaşları PCI genindeki varyasyonlarla infertilite arasında bir ilişki bulamamışlardır. Bununla ilişkili, Bungum ve arkadaşları PCI geninin 6. ekzonunda bulunan bir varyasyon ile 5 erkekte invitro fertilizasyon sonrası açıklanamayan fertilize kaybı olduğunu ortaya koymuşlardır (38, 39) .

Pulmoner Arteriyel Hipertansiyonda PCI: Tekrarlayıcı pulmoner emboliler ve kalp yetmezliğine yol açan pulmoner arteriyel hipertansiyon nadir görülen bir hastalık olup sıklığı milyonda bir'dir. Protein C eksikliği tarafından oluşturulan fazla pıhtılaşma bozukluğu pulmoner embolizmanın az rastlanan bir sebebidir. Nishii ve arkadaşları ; PCI transgenik farelerle yapılan bir çalışmada PCI'nın trombin inhibisyonu yoluyla pulmoner hipertansiyon etkisini azalttığını göstermişlerdir (40).

Doku Tamiri ve Rejenerasyonunda PCI: PCI, doku tamiri ve rejenerasyonunu hepatosit büyüme faktörü aktivatörünün regülasyonunu sağlayarak yapmaktadır. Hepatosit büyüme faktörü (HGF) doku rejenerasyonunda proliferasyonu, endotelial ve epitelyal çeşitli hücre tiplerinin hareketinin stimülasyonunu sağlayarak kritik rol oynamaktadır (35) . HGF, hepatositlerde sentezlenmekte ve proHGFA inaktif formu halinde bulunmaktadır. Trombin, proHGFA'nın HGFA'a aktivasyonundan sorumludur. PCI, HGFA'ı enzim-inhibitör kompleksi oluşturarak inhibe etmektedir. HGF aktivatörünün inhibisyonu yoluyla PCI nin doku rejenerasyonu, tamiri ve yara iyileşmesinde önemli rol oynaması akciğer rejenerasyonu tedavisi için potansiyel bir hedef olabileceğini düşündürmektedir (41)

Proteomik Hedef olarak PCI: PCI iki tip proteomik analizde: Multipl skleroziste potansiyel terapötik hedef ve prostat kanserinde biyomarker olarak incelenmektedir (42,43). İlk olarak multipl sklerozis lezyon tiplerinde proteinler tanımlanmış; lezyonlar akut plak, kronik aktif plak ve kronik plak olarak sınıflandırılmıştır. Karşılaştırmalı proteomik analizlerde birçok proteinin fonksiyonu tanımlanamamasına rağmen koagülasyonda yer alan doku faktörü ve protein C inhibitörünün kronik plakda yer aldığı görülmüş ve işlevselliği kanıtlanmıştır. Otoimmün ensefalomyelitli farelerde hastalığın şiddeti in vivo deneylerle rekombinant APC veya hirudin kullanılarak azaltılmıştır. Bu deney PCI'nın multipl sklerozis için potansiyel hedef olduğunu ve APC nin de terapötik bir seçenek olduğunu düşündürmüştür. PCI nin kanser, kanser gelişimi ve fertilizasyondaki önemli rolü gözününe alınarak prostat kanserinde biyomarker olarak kullanılmasıyla ilişkili yapılan diğer proteomik çalışmada PCI peptidinin biyokimyasal mekanizmasının tam olarak aydınlatılması için yeni deneylere ihtiyaç duyulduğu sonucuna varılmıştır (44)

2.2.2. Protein C İnhibitör Geni (PCI/ SERPINA5)

PCI, 57kD moleküler ağırlıklı tek zincirli bir glikoproteindir. İnsan PCI'nın primer öncü yapısının 5' ucunda kodlama yapmayan bir bölge, 19 aminoasitlik sinyal peptidi, 387 aminoasitlik olgun protein, sonlandırma kodonu (stop kodon), 3' ucunda kodlama yapmayan 839 baz çiftlik bir bölgeden oluştuğu bilinmektedir.

Molekül, içerisinde 5 tane glikozilasyon bölgesi içerir: 3 tane Asn-X-Ser/Thr dizileri, 2 tane Thr/ Ser-X-X-Pro dizileri. İnsan PCI geni 14. kromozomun uzun kolunda 32.1 (14q32.13) lokalize olan, 45702 Da ağırlığında, 5 ekzon, 4 intron'dan oluşan bir gendir (45). Gen, 5' ucunda transkripsiyon faktörü Sp-2 bağlanma bölgesi, Aktivatör protein (AP) bağlanma bölgesi, inverted Ap bağlanma bölgesi gibi çeşitli cis elementleri içerir ancak TATA kutusu ve CCAAT kutusu sekanslarını içermez. PCI aminoasit dizileri türler arasında sırasıyla maymun, sığır, tavşan, sıçan, hamster ve tavukta %93, %71, %72, %62, %63 ve %46 benzerlik göstermektedir (31).

Çalışmada pediatrik inme tanısı almış hastalarda olası PCI gen değişimlerini belirleyerek Türk populasyonunda ilk kez PCI ile pediatrik inme arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amaçlanmıştır.

2.2.3. Pediatrik inme

İnme; bir serebral damarın tıkanması sonucu bir infarkt ya da anormal bir damarın yırtılması (anevrizma) ya da beyin parankiminde arteriyel yırtılma sonucu spontan kanama ile gelişen bir sendromdur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ise inmeyi; ani gelişen, 24 saat veya daha uzun süren, ölüme yol açabilen, damarsal kökenli, fokal veya global serebral fonksiyon bozukluğu ile oluşan klinik bulgular olarak tanımlamıştır. İnme, dünyanın en önemli üçüncü büyük ölümcül hastalığıdır (46). Ülkemizde inme sıklığı ve prevalansına dair sağlıklı bilgiler bulunmadığı için epidemiyolojik veriler daha çok Batı toplumlarına dayanmaktadır. Batı toplumlarında epidemiyolojik veriler toplumların %0.2 sinin her yıl inme geçirdiğini göstermektedir (47). İnme geçiren kişilerin üçte biri ertesi yıl ölmekte, üçte biri sakat kalmakta, üçte biri ise kısmen iyileşmektedir. Toplamda her yıl 660/milyon kişi inmeden dolayı yaşamını kaybetmekte, yaşayan 1300/milyon kişi ise inmeden dolayı değişik derecelerde sakat kalmaktadır.

2.2.4. Risk Faktörleri

İnme tedavisindeki yeni gelişmelere rağmen epidemiyolojik çalışmalarla risk faktörlerinin belirlenmesi tedavi ve koruyucu hekimlik açısından büyük önem taşımaktadır.

Risk faktörleri değiştirilemeyen ve değiştirilebilen risk faktörleri olarak kategorize edilmektedir.

Tablo 2.1. İnmede risk faktörlerinin sınıflandırılması

I– Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

- a) Yaş
- b) Cinsiyet
- c) Irk
- d) Aile öyküsü

II– Değiştirilebilen Risk Faktörleri

- | | |
|---|----------------------------------|
| a) Kesinleşmiş Faktörler | b) Kesinleşmemiş Faktörler |
| 1. Hipertansiyon | 1. Alkol Kullanımı |
| 2. Değişik derecelerde glukoz intoleransı | 2. Obezite |
| 3. Kalp Hastalıkları | 3. Beslenme Alışkanlıkları |
| 4. Hiperlipidemi | 4. Fiziksel İnaktivite |
| 5. Sigara | 5. Hiperhomosisteinemi |
| 6– Asemptomatik karotis stenozu | 6. İlaç Kullanımı ve Bağımlılığı |
| 7– Orak hücreli anemi | 7. Hiperkoagülibilite |
| | 8. Hormon Tedavisi |

Tüm inme tipleri için bağımsız bir faktör olan yaş ilerledikçe inme riski artmaktadır. Yapılan araştırmalarda 55 yaşından sonraki her 10 yılda inme riskinin 2 kat artış gösterdiğini ortaya koymaktadır (48). 55-64 yaşlarda yıllık inme insidansı 1.7-3.6/1000 kişi, 65-74 yaş arası 4.9- 8.9/1000 kişi, 75 yaştan sonra 13.5-17.9/1000 kişidir (49,50). Kadınlarda 55- 64 yaş arası inme insidansı erkeklere göre 2-3 kat daha azdır. 85 yaşına doğru ise bu fark azalmaktadır. Genç kadınlarda gebelik ve oral kontraseptif riski

arttırırken, ileri yaşlarda olan erkeklerde kardiyovasküler hastalıklar sebebiyle meydana gelen erken ölüm neden olarak gösterilmektedir (51).

Hastalık üzerine ırk ve etnik kökenlerin etkisine bakılarak yapılan çalışmalarda ise siyah ırkta beyaz ırka göre inme insidansının daha yüksek olduğu bulunmuştur (52)

Değiştirilemeyen risk faktörlerinden aile öyküsünün risk faktörü olmasında ise beslenme alışkanlıkları, benzer yaşam tarzları, çevresel faktörler ve bazı genetik özellikler rol oynamaktadır. Bazı hastalarda metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) geninde bir ya da daha fazla mutasyon olması kanda homosistein seviyesinin artmasına neden olmaktadır. Faktör V Leiden (FVL) mutasyonu, protein C, protein S eksikliği ve diğer faktör eksiklikleri venöz tromboz riskini artırmaktadır. Çeşitli koagülasyon faktörleri otozomal resesif olarak kalıtılmaktadır ve çocukluk döneminde intranial kanamalara yol açmaktadır. İnmenin genetik komponentlerini araştıran bir çalışmaya göre çeşitli haplotip tipleri ile inme arasında ilişki olduğu ortaya konulmuştur ancak henüz patojenik olarak bir mutasyon saptanamamıştır (53).

Değiştirilebilen risk faktörlerinden; hem iskemik hem hemorajik inme için major risk faktörü oluşturan hipertansiyon da kan basıncı ne kadar yüksekse inme olasılığı da o kadar artmaktadır (54). Bir diğer faktör olan sigara ise koagülabilité ve kan viskozitesini artırır, fibrinojen düzeyini yükseltir, trombosit agregasyonunu hızlandırır ve kan basıncını yükseltir. Hemen hemen tüm inme risk faktörlerinin incelendiği geniş ölçekli çalışmalarda (55) sigara içiminin iskemik inme için kuvvetli bir risk faktörü olduğu, diğer risk faktörlerine göre düzeltme yapıldıktan sonra riski yaklaşık 2 kat arttırdığı ortaya konulmuştur. Ayrıca sigaranın hemorajik inme riskini de 2 ile 4 kat arttırdığı belirlenmiştir. Diabetes mellitus inme için bağımsız bir risk faktörüdür ve yapılan çalışmalarda diyabet mellitus'un büyük damar aterosklerozunu hızlandırdığı, düşük ve yüksek dansiteli lipoprotein kolesterolleri üzerine olumsuz etkide bulunduğu ve hiperinsülinemi yoluyla aterosklerotik plağı büyüttüğü gösterilmiş ve inme için 1.8-6 kat risk getirdiği gösterilmiştir (56).

Semptomatik ve asemptomatik kardiyovasküler hastalıklar, serebrovasküler hastalıklarla güçlü bir ilişki içerisindedir. İskemik inmelerin %15-20 si kalp kaynaklı embolidir. Yaşlı kişilerde kalp kökenli embolilerin 2/3'sini oluşturan en önemli sebep atriyal fibrilasyondur. Atriyal fibrilasyon (AF) en sık görülen aritmidir ve AF'li hastalarda yıllık

inme oranı %5'dir. Bununla beraber, bu oran farklı hasta alt gruplarında çok değişmekte ve yılda % 0,5-12 arasında değişen oranlar görülebilmektedir (57).

Serum lipid bozuklukları koroner arter hastalıkları için kanıtlanmış bir risk faktörü olmakla birlikte iskemik inmeyle ilişkisi tartışmalıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalar serum kolesterol düzeyi 240–279 mg/dl değerlerinde riskin 1.8; 280 mg/dl üzerinde ise 2.6 olduğunu göstermiş hiperkolesteroleminin iskemik inme riskini artırdığı şeklinde sonuç vermiştir.

Asemptomatik karotis stenoz inmenin sık görülen nedenlerinden biridir. Asemptomatik %50-99 karotis darlığı olan kişilerde yıllık inme riski %1 ile %3.4 arasında değişmektedir. Özellikle hızlı progresyon gösteren darlıklarda bu risk stabil darlıklara göre daha yüksektir. %75' in altındaki darlıklarda yıllık inme riski, %1.3 iken, % 75' in üstündeki darlıklarda %3.3' tür. (58)

Orak hücreli anemiye bağlı inme modifiye edilebilir, yaşam tarzına bağlı olmayan bir risk faktörüdür. Orak hücreli anemi otozomal resesif olarak kalıtılan bir hastalık olup anormal gen ürünü değişmiş bir hemoglobin β zinciridir.. Prevalansı çok düşük olan bu hastalıkta inme riski çok yüksektir, 20 yaşına kadar inme prevalansı %11''dir (59)

Kesinleşmemiş Risk Faktörlerinden alkol kullanımının inme için risk faktörü olup olmadığı miktarıyla orantılıdır. Az miktarda alkol tüketiminin HDL kolesterol artışı, trombosit agregasyonunda azalma, fibrinojen azalması gibi mekanizmalarla iskemik inme riskini azalttığı öne sürülürken, yüksek miktarlarda alkol tüketiminin hipertansiyon, hiperkoagülabilité ve kardiyak aritmilerde artışa yol açarak riski artırdığı bilinmektedir (60).

Obezite tanım olarak, vücut kitle indeksinin (VKİ) (kg/metre^2) ≥ 30 olmasıdır. İnme ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olarak görülen obezite tipi abdominal obezitedir. Özellikle erkeklerde sık görülen abdominal obezite, genellikle hipertansiyon, diyabet ve hiperlipidemi ile birlikte olduğundan, inme için risk faktörü olarak kabul edilmektedir (61).

Yapılan araştırmalar fiziksel aktivite, diyet ve inme arasındaki ilişki olduğunu göstermektedir. Orta ve yüksek düzeyde fiziksel aktivitenin inme riskini azalttığı bu durumun HDL kolesterol seviyesinin artışına bağlı olabileceği ortaya konmuştur. Konuyla ilgili diyetle tahıl, sebze, meyve ve balık tkretimini koruyucu olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (62).

Plazma homosistein düzeyinin 16 mikromol/L zerindeki değerleri hiperhomosisteinemi olarak kabul edilmektedir ve homosistein konsantrasyonu yaşla birlikte artmaktadır. Bunun yanısıra vitamin B12, folik asit ve vitamin B6' nın çevresel eksikliği homosistein metabolizmasını etkileyerek dolaşımda serum homosistein seviyesini yükseltir. Homosisteineminin inme ile arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır (63).

İlaç kullanımı ve bağımlılığı ile inme arasında ilişki olduğu bilinmektedir ve inmeyle en çok ilişki kurulan madde kokaindir. Amfetamin, eroin gibi diğer maddelere bağımlılığın inme riskini (hem iskemik hem de hemorajik) arttırdığı bilinmektedir. Bu ilaçlar kan basıncında değişime yol açmakta, embolilere neden olmakta, hematolojik anormallikleri de yol açarak, kan viskozitesine ve trombosit agregasyonuna öncülük etmektedir (64)

Protein C ve Protein S eksikliği, APC rezistansı, antitrombin III eksikliği ve protrombin 20210 mutasyonu gibi edinsel veya kalıtlımiş hiperkoaglibilite durumlarının venöz tromboza yol açmakla beraber iskemik inmeyle de ilişkili olduğu bilinmektedir. Özellikle gençlerde antifosfolipid antikoru da tekrarlayan inmelerden sorumludur (65).

Oral kontraseptiflerin inme riski, içeriklerindeki estradiol miktarı ile ilişkili olup, 50 mikrogramdan fazla estradiol içeren ilaçlarda bu risk yüksektir (66).

İnmeler nöroradyolojik, kardiyolojik, hematolojik ve biyokimyasal tetkikler göz önüne alındığında serebral iskemi, intraserebral hemoraji ve subaraknoid kanama olmak üzere üç ana grupta toplanmıştır. İskemik inmeler, tüm inmelerin %80-90'ını oluşturmaktadır ve doğal inhibitörlerin eksikliğinin de bu klinik tablonun ortaya çıkmasında etkin olduğu bilinmektedir. İskemik inmelerde aterosklerozun rolünün %27-43 olduğu bildirilmiştir (67). Beyin dokusunun iskemiye toleransı çok sınırlıdır. Beyini besleyen damarlarda kan akımı kesildiği zaman iskemiye hassas bölgelerde çok kısa bir sürede kalıcı hasar meydana gelmektedir. Beyin kan akımı normalin %20 sinden daha fazla azaldığı zaman beyin

dokusundaki Adenozintrifosfat (ATP) hızla tükenmekte, anoksik depolarizasyon dalgaları çıkmakta ve hücre içi Ca^{++} miktarı artmaktadır. Kalsiyum; proteaz, endonükleaz, fosfolipaz ve kinaz gibi birçok katabolik enzimin aktivasyonuna neden olurken, mitokondriyumlarda şişme ve fonksiyon bozukluğuna da yol açarak hücrenin enerji kaynağını bozmaktadır. Ayrıca oluşan serbest oksijen radikalleri, nitrik oksit ve peroksinitrit de çeşitli yollarla apoptotik ve nekrotik hücre ölümüne katkıda bulunmaktadır.

Hemorajik (Kanamalı) iskemiler ise kanamanın olduğu anatomik bölgeye göre intraserebral ve subaraknoid kanamalar olmak üzere sınıflandırılırlar. İnme altgruplarının görülme sıklığı subaraknoid kanamalarda %3-10, intraserebral hemorajide ise %10-15 olarak bilinmektedir (68).

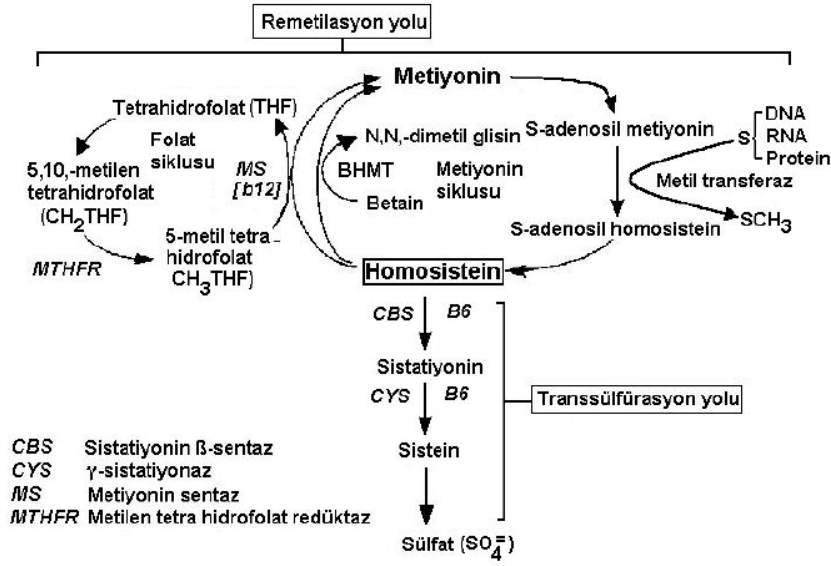
2.3. HOMOSİSTEİN

Homosistein (2-amino-4-merkaptobütirik asit), metioninden bir metil grubunun ayrılmasıyla ortaya çıkan, proteinin primer yapısında yer almayan kükürtlü bir aminoasittir. İlk olarak 1932 yılında Butz ve du Vigneaud tarafından tanımlanmıştır (69). 1952 yılında araştırmacılar insülin ile ilgili bir çalışma yaparken konsantre asit ile muamele edilmiş metiyoninden bir ara ürün elde etmişler ve deney sırasında araştırmacıların insülinde metiyoninin yokluğunu bilmemeleri ve insülinde bulunan sülfürü hesaba katmaları homosisteinin keşfini sağlamıştır.

2.3.1. Homosistein metabolizması

Homosistein, diyetle alınan ve endojen proteinlerden sentezlenen metiyoninden metabolize olan thiol'lü esansiyel bir aminoasittir. Tüm hücrelerde bulunan metiyonin, hem protein sentezi hem de S-Adonozilmetiyoninin (SAM) oluşmasını sağlayan bir maddedir. Metiyoninin ihtiva ettiği metil grubu, adozin 3-fosfat (ATP) ve metiyonin adozil tranferaz enzimleri (MAT I, II, III) ile SAM'e dönüşür. SAM organizmalarda başlıca metil grubu vericisidir (70). Bu dönüşüm metiyoninin kükürt atomuna ATP'den bir adozil grubunun bağlanmasıyla gerçekteşir ve adozil grubunun aktarılmasıyla kükürt atomu pozitif yük ile yüklenir. Bu durum sonucunda kükürt oldukça reaktif bir duruma geçerek içerdiği metil grubu akseptör, substratlarca kolayca transfer edilir ve sonucunda S-Adozil Homosistein (SAH) oluşur. Bu molekül de daha sonra adozin ve homosisteine hidrolizlenir (70).

Homosistein kofaktör olarak vitamin B12 (kobalamin) kullanılırsa remetilasyonla tekrar metiyonine veya vitamin B6 kullanılırsa transsülfürasyonla sisteine olmak üzere iki yolla metabolize olmaktadır. Remetilasyon yolunda homosistein kofaktör olarak vitamin B₁₂'nin substrat olarak da 5-metiltetrahidrofolatın (5-MTHF) kullanıldığı ve metiyonin sentaz (MS) enziminin görev yaptığı bir reaksiyonla metillenir ve metiyonine tekrar dönüşür. Bu metabolik yolun substratı olan 5-MTHF termolabil MTHFR enziminin katalizlediği bir reaksiyonla metilentetrahidrofolat (MTHF)'tan sentezlenir. Transsülfürasyon yolunda ise homosistein, kofaktör olarak vitamin B₆'yı (pidoksin) kullanan sistationin beta sentaz (CBS) enzimi aracılığıyla sistationine çevrilir. Sistationin ise vitamin B₆'nın kofaktörlüğünde sistationinaz enzimi ile sistein ve α -ketobutirata çevrilir, α -ketobutirat ise 2-metilsitrik asit ve metilmalonik asite parçalanır (71).



Şekil 2.6. Homosistein metabolizmasında yer alan yollar

Homosistein metabolizması, karışık görünmesine rağmen oldukça düzenli bir feed back mekanizmasına sahiptir. Eğer metiyonin dengesi bozulmuşsa ve SAM düşük konsantrasyonda bulunuyorsa, homosistein öncelikle metiyonin oluşumu için metiyonin sentaz (MS)'in görev aldığı remetilasyon yoluna yönelir. Homosistein düzeyi yükseldiğinde ise S-Adenozil homosistein miktarı artar. Çok sayıda metabolik etkilere sahip olan SAH, farklı bağlanma bölgelerinde SAM ile rekabet içindedir ve bu özelliği ile metilasyonu engelleyebilir. Bu sebepten araştırmacılar, SAM/SAH oranı metilasyon döngüsünde indikatör olarak görev alabileceğini düşünmüşlerdir (72). MTHFR enziminin katalizlediği bir reaksiyon sonucu oluşan metilentetrahydrofolat ise metiyoninin homosisteine dönüşümünde MS için substrat olması nedeniyle önemli bir işleve sahiptir.

İnsan plazmasında, homosistein birkaç formda bulunur. Yaklaşık %70-80'i temel olarak albümine olmak üzere proteinlere disülfid bağları ile bağlıdır. Geri kalan homosistein oksitlenerek dimerler (*homosistin*) veya sisteinle birleşerek mikst disülfidler oluşturur. Total plazma homosistein komponentleri ve yüzdeleri Çizelge 1.2'de verilmiştir (Ueland et al,1993). Homosistein, çok küçük bir oranda (<%1) dolaşımında serbest olarak bulunur. Toplam homosistein bütün bu serbest ve bağlı biokimyasal homosistein türlerinin toplamını tanımlar. Pekçok araştırmada, sağlıklı yetişkinlerde total homosistein konsantrasyonu plazmada 5-15 µmol/L, serumda ise 13-18 µmol/L olarak tespit edilmiştir. Pediatrik hastalardaki normal değeri 3.7-10.3 µmol/L'dir (73,74).

Koroner, serebrovasküler ve periferel vasküler hastalıklı bireylerde genellikle hafif bir homosisteinemi gözlenmektedir (12-25 µmol/L). Buna karşılık eğer renal fonksiyon bozulursa ya da birey renal hastalığın son safhasındaysa, total homosistein orta seviyedeki konsantrasyonlara erişebilir (25-50 µmol/L). Daha üst sınırlardaki homosistein düzeyi ise (50-500 µmol/L) hiperhomosisteinemiye neden olmaktadır (75).

Çizelge 2.1. Total plazma homosistein komponentleri ve yüzdeleri

İndirgenmiş (redükte)		
Homosistein	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{}^-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-SH} \end{array}$	%1
Yükseltgenmiş (Oksidize)		
Homosistin	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{}^-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-S} \\ \\ \text{}^-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-S} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	%5-10
Mikst disülfidler:		
Proteine bağlı homosistein	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{}^-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-S} \\ \\ \text{Protein} \\ \\ \text{S} \end{array}$	%80-90
Sistinli homosistein	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{}^-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-S} \\ \\ \text{}^-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{-S} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	%5-10

Normal oran	5-15 µmol/L
Arzulanan	<10 µmol/L
Hiperhomosisteinemi	
Hafif	15-25 µmol/L
Orta	25-50 µmol/L
Ağır	50-500 µmol/L

2.3.2. Homosistein Düzeyini Etkileyen Faktörler

Homosistein düzeyinin değişimi kişisel özellikler, yaşam tarzı, geçirilen hastalıklar, kullanılan ilaçlar gibi birçok fizyolojik etmeden kaynaklanacağı gibi genetik kökenli de olabilir.

a. Kişisel özellikler: Yaş, cinsiyet ve sigara kullanımı gibi etmenler sayılabilir. Kadınlar, erkeklerden daha düşük homosistein düzeyine sahiptir ve bu düzey yaşla birlikte artar. Bu, kısmen vitamin durumuna bağlıdır; fakat cinsiyet hormonlarının etkisinden de ileri gelebilir. Plazma homosistein seviyeleri kadınlarda menapozdan sonra artar. Bu da erkeklerle karşılaştırılan kadınlarda yaşla ilgili artışı açıklayabilir. Aşırı sigara, alkol ve kafeinli kahve içen kişilerde homosistein düzeyi yükselirken fizyolojik aktivite ile bu düzey düşmektedir. Bu tür hayat tarzı faktörlerinin etkisi kadınlarda erkeklerden daha belirgindir. Kronik alkoliklerde, etanolün vitamin durumunu etkilemesi sonucu

homosistein düzeyi artarken; orta derecede etanol tüketenlerde homosistein düzeyi düşmektedir. (76)

b. Klinik Hastalıklar ve Kullanılan İlaçlar: Kronik böbrek yetmezliği, akut lenfoblastik lösemi ve diyabet hastalığı olan bireylerde yüksek homosistein düzeyi yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. Diyetle alınan vitamin B₆, B₁₂ ve folat düzeyi ile homosistein düzeyi de ters orantılıdır. Kullanılan metotreksat (dihidrofolat redüktaz inhibitörü), Fenitonin ve karbamezapin (folat antagonistleri), Nitrik oksit (vitamin B12 antagonisti), 6-azouridin triasetat (vitamin B12 antagonisti) türevi ilaçların da homosistein düzeyine olan etkileri bilinmektedir.

c. Genetik Faktörler: Homosistein metabolizmasını oluşturan temel yollar olan transsülfürasyon ve remetilasyon yollarındaki enzimatik anormallikler konjenital veya kazanılmış olabilir. Homosistein metabolizmasında rol oynayan sistatyonin β sentaz (CBS), metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR), Metiyonin sentaz (MS) gibi enzimlerin kalıtsal defektlerinde hiperhomosisteinemi görülebilmektedir.

Homosistein düzeyinin dengelenmesi remetilasyon yoluyla olabildiği gibi CBS enziminin görev aldığı transsülfürasyon yolu ile de sağlanır. CBS enziminin katalizlediği reaksiyonla homosistein sisteine indirgenir. CBS enziminin aktivitesinin azalması başlıca üç tip hastalıkla ilişkilendirilir. Birincisi homozigot olarak görülen CBS eksikliğinin sebep olduğu homosisteinüri (77), ikincisi CBS'deki kısmi bir eksiklik ise hafif seyreden hiperhomosisteinemi ve sonucunda aterosklerozise sebep olması (78) üçüncü olarak enzim eksikliğinden kaynaklanan down sendromunun görülmesidir (79)

2.3.3. Homosisteinüri

Homosisteinüri ilk kez 1962 de Carson, Neil, Garritson ve ark.'ları tarafından tanımlanmış konjenital metabolik bir hastalıktır (80). Görülme sıklığı canlı doğumda 1/100.000-200.000 olan bu nadir hastalık, sistatyonin β-sentaz (CBS), metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) ve metiyonin sentaz (MS) enzimlerinin eksikliği ile ortaya çıkmakta ve otozomal resesif bir mekanizmayla kalıtılmaktadır. Homosisteinürinin görülme nedenlerinden en önemlisi homosisteinin ve sistatyonine dönüşümünü sağlayan CBS enziminde eksikliklerdir. CBS eksikliği genetik olarak heterojen olup homozigot CBS

eksikliği daha sık görülmektedir. Homozigot CBS eksikliği olan bireylerde transsülfürasyon yoluyla homosistein katabolizması bozulmuştur. Vücut sıvılarında metiyonin, homosistein birikirken, sistein ve sistin miktarı azalmaktadır (81)

Homosisteinürinin nadir formları ise homosisteinin remetilasyonunda bozulma, kobalamin metabolizmasındaki hatalar ve belki de en önemlisi şiddetli MTHFR defektleri sonucu ortaya çıkmaktadır. Homosisteinin remetilasyon döngüsünde görevli olan MTHFR enzimi 5,10 metilentetrahidrofolatı (5,10-metilenTHF) geri dönüşümsüz olarak 5-metil tetrahidrofolata (5-metil THF) dönüştürür. 5-metil THF ise DNA metilasyonu ve metiyonin sentezi için metil grubu sağlar. MTHFR geninde meydana gelen bir mutasyon enzim aktivitesini azaltmakta, azalan MTHFR aktivitesi 5- metil THF düzeyinin azalmasına neden olmakta ve 5,10- metilen THF miktarı ile plazma homosistein düzeyi artmaktadır (82).

MTHFR geninde en sık görülen C677T mutasyonu genin 677. nükleotidinde Sitozin yerine Timin bazının gelmesi sonucu Alanin aminoasidinin Valine dönüşmesiyle ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyon enzim aktivitesinde azalmaya, termolabiliteye ve folat metabolizma bozukluklarına neden olarak orta (15-30 µmol/L) veya daha yüksek (30-100 µmol/L) hiperhomosisteinemiye neden olmaktadır. Yine aynı şekilde bu gende görülen bazı mutasyonlar, enzimde inaktivasyon oluşturarak, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olan hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşmasına neden olmaktadır (83, 84).

CBS enzim eksikliğinden kaynaklanan homosisteinüri yüksek dereceli miyop, lens kayması gibi defektlerle gözü, osteoporoz, marfanoid özelliklerle iskelet sistemini, erken aterosklerozis ve trombolizm ile vasküler sistemi ve mental retardasyon, psikolojik rahatsızlıklarla merkezi sinir sistemi olmak üzere dört major organ sistemini etkilemektedir.

Homosistein'in endotelial disfonksiyona, düz kas proliferasyonuna, ekstrasellüler matriks proliferasyonuna, lipid oksidasyonuna, sitotoksositeye veya koagulasyon ve trombositlere etkisi sonucu vasküler hasara neden olabileceği ileri sürülmüştür (77,85)

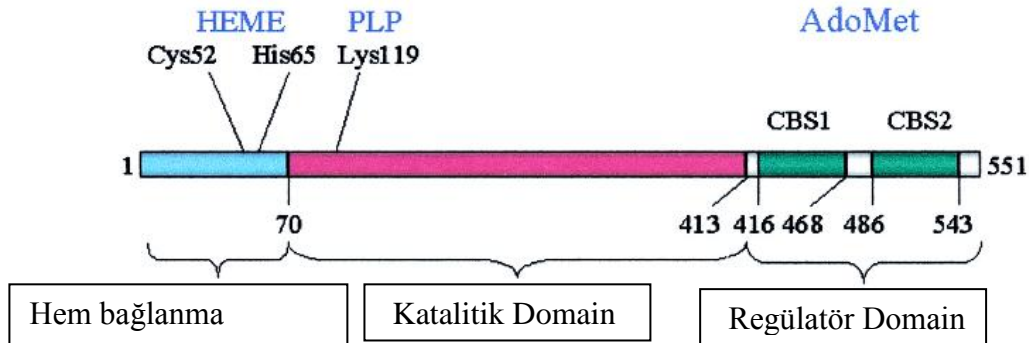
Homosistein faktör XII ve faktör V'in aktivitelerini hızlandırıp protein C'nin aktivasyonunu baskılayarak endotelin normal antitrombotik özelliğini değiştirmektedir.

Aynı zamanda endotelde heparan sülfat ve trombomodulin salınımını baskımlarken doku faktörü salınımını uyaran homosistein, trombin oluşumunu hızlandıran protrombotik bir ortam yaratmaktadır.

Tsai ve ark.'ları hiperhomosisteineminin direkt olarak vasküler endotel hücrelerinde hasara neden olabileceğini, endotelin antikoagulan özelliğini prokoagulana dönüştürebildiğini ve in vitro düz kas hücrelerinde proliferasyona neden olabileceğini göstermişlerdir. Homosistein, vasküler düz kas hücrelerinde mitogeneze ve sitotoksik etkiye de neden olabilmektedir (86)

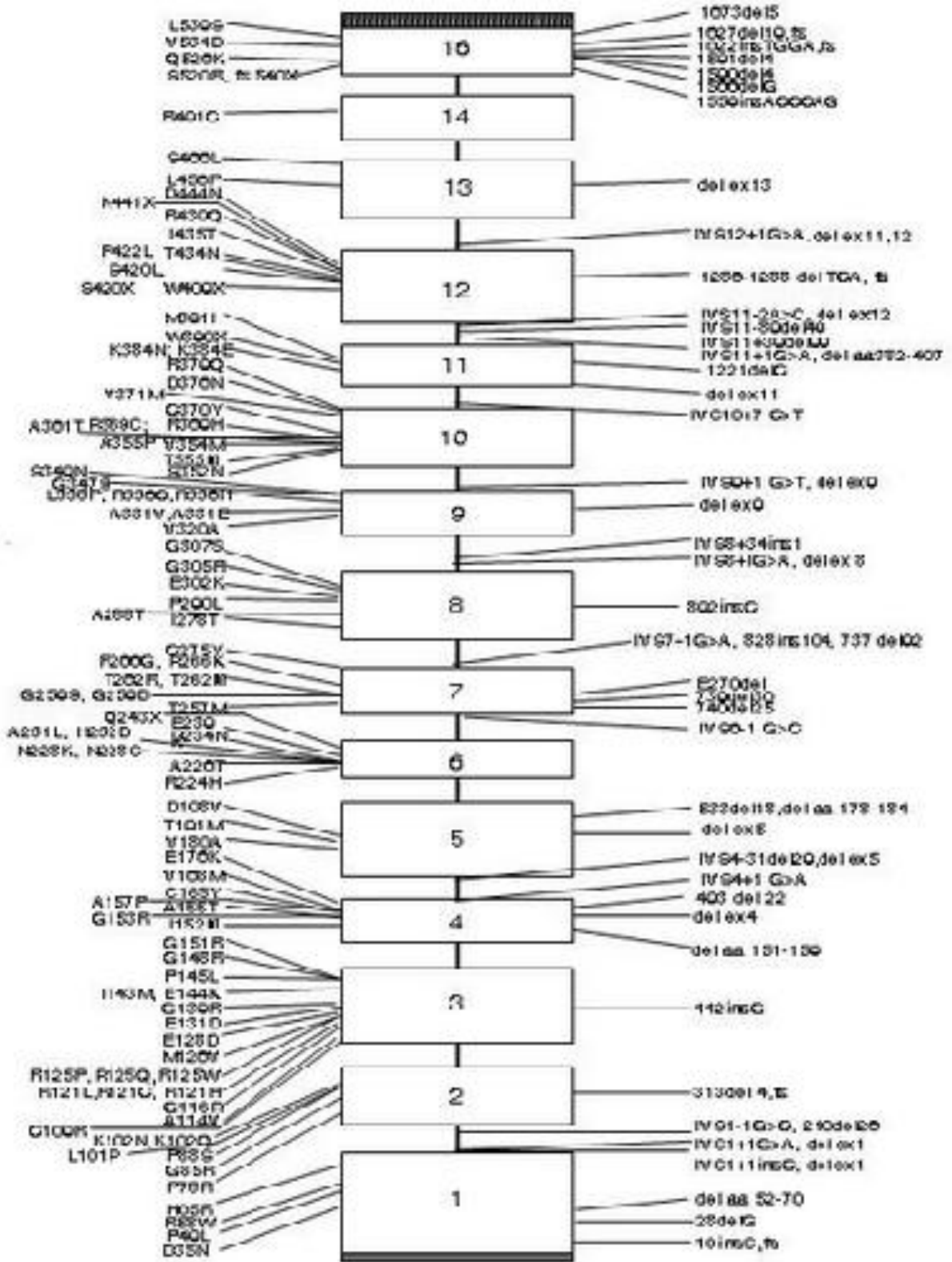
2.3.4. Systationin B Sentaz (CBS) Geni

1984 yılında Skavby ve ark.'ları tarafından insan ve hamster hibritlerinde yapılan çalışma sonucu CBS geninin pridoksal 5' fosfat (PLP) enzim ailesinin üyesi olduğu tespit edilmiştir. 1986 yılında Kraus ve ark.'ları yaptıkları in situ hibridizasyon deneyleriyle bu çalışmayı desteklemişlerdir. CBS, homotetromer olan 63 kDa'lık dört monomerden oluşmuştur ve bu monomerler 551 amino asit uzunluğunda ve üç ana yapıdan meydana gelmiştir. 63 kDa'lık tetramer sentezlenip proteolitik aktiviteye uğrayarak 45 kDa'a indirgenir. Enzimin 45 kDa'lık aktif çekirdek bölgesi Glu 37'den Arg 413'e kadar uzanmakta ve PLP ile bağılı olarak bulunmaktadır. Bitki ve bakterilerden izole edilen CBS'in bu 45 kDa'lık aktif bölgesi evrim boyunca enzimin en çok korunmuş kısmıdır. Bundan dolayı diğer enzimlerle benzerliğin olduğu kısım enzimin aktif bölgesidir.



Şekil 2.7. CBS yapısı

CBS geni 21. kromozomun uzun kolunda lokalize (21q22.3) olup 17 ekzondan oluşmakta ve 551 aminoasit kodlamaktadır. CBS geninde bir çok DNA dizi tekrarları ve tek nükleotidlik baz değişimleri bulunmaktadır. Günümüze kadar gende 168 mutasyon tanımlanmıştır ve bu mutasyonların 107 tanesini missense (yanlış anlamlı) mutasyonlar oluşturmaktadır (Human Gene Mutation Database-HGMD). 1985'te Mudd ve arkadaşları sülfür amino asit metabolizması üzerine yaptıkları çalışmada CBS mutasyonlarının en çok görülen enzim eksikliği olduğunu göstermişlerdir.



Şekil 2.8. CBS geninde tanımlanan mutasyonlar (Kraus ve ark'larının yaptığı çalışmadan alınmıştır (87).

Gende 8. ekzonda yeralan 833T>C değişimi, 7.intronun 3'ucu ile 8.ekzonun 5' ucu arasında tanımlanan 68 bç'lik insersiyon (844ins68) en sık rastlanan mutasyonlardır. 68 bç'lik insersiyonun 53 nükleotidi 7.intronda , 15 nükleotidi ise 8.ekzonda yer almaktadır. İnsersiyon işlevsiz bir proteinle sonuçlanan terminasyon kodonunu oluşturmaktadır. CBS844ins68 mutasyonunun enzim aktivitesini etkileyerek homosistein düzeyini azalttığı tespit edilmiştir (88,89). Bu sebeple mutasyonun vasküler tromboembolik hastalıklara karşı koruyucu bir etkisi olduğu düşünölmüştür. Araştırmacılar bu mutasyonun cis konumunda 833T>C değişimi ile beraber bulunduğunu saptamış ve bu durumu T833C/844INS68 olarak rapor etmişlerdir. Franchis ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada 68 bç'lik insersiyonun MTHFR 677 C>T mutasyonu ile beraber bulunmasının venöz ve arteriyel oklüzif hastalıklara yol açtığını bulmuşlardır.

Ölkemizde yapılan çalışmalarda Karaca ve ark'ları 11 ailede homosistinüri tanısı almış 13 hasta ile yaptıkları çalışmada 12 mutasyon bulmuşlardır, bu mutasyonlardan 3 tanesi (p.D281V, p.L251P, IVS-2A>T) ilk kez tanımlanmıştır. Ekzon 7, 8 ve 10 da tanımlanan bu mutasyonların CBS enziminin katalitik domaini etkilediği gösterilmiştir (90).

2.4. FAKTÖR V+FAKTÖR VIII KOMBİNE EKSİKLİĞİ

Nadir faktör eksiklikleri otozomal resesif kalıtılan, 1/500000-1/2 milyon sıklığında karşılaşılan pıhtılaşma faktörü eksikliklerini tanımlar. Fibrinojen, FII, FV, FV+FVIII, FVII, FX, FXI ve FXIII tüm kalıtsal faktör eksikliklerinin % 3-5'ini oluşturmaktadırlar. Kombine FV+FVIII eksikliği ise milyonda bir görülen kanama bozukluğu olup konuyla ilgili 2009 verilerine göre dünyada 50, ülkemizde 22 olgu tanımlanmıştır (91,92).

Faktör V (FV), pıhtılaşma sistemindeki en önemli proteinlerden biridir. Megakaryositler ve lökositler tarafından üretilmekte olup trombositlerin, endotelial hücrelerin ve monositlerin yüzeyinde bulunmaktadır. FV tek zincirli glikoprotein yapısında, plazma konsantrasyonu 4-10 ng/mL olup moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 330.000 kDa dur. FV eksikliği olan hastalarda plazma ve trombositlerde FV aktivitesi ya yoktur ya da azalmıştır. Faktör X tarafından aktive olan FV, protrombinin trombine dönüşmesini sağlayan önemli bir kofaktördür. FV azlığında veya yokluğunda trombin oluşumu yavaşlayarak fibrin oluşumu gecikir ve defektif olur. FV, Faktör Xa, Ca⁺⁺ ve fosfolipid beraberce protrombinaz kompleksini oluştururlar. FV'in %80'i plazmada bulunurken %20 kadarı da trombositlerde bulunur. FV'in ana rolü trombositlerin yüzeylerinde protrombinaz kompleksi oluşumuna katılmak ve katkıda bulunmaktır (93).

FV geni X kromozomu üzerinde lokalizedir ve 25 ekzon içermekte olup 2757 aminoasidi kodlamaktadır. İnsan ve fare Faktör V geni üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda değişik mutasyonlar belirlenmiştir. Bunlar içerisinde en sık görüleni Faktör V (G1691A) ve Faktör V (H1299R) mutasyonlarıdır. Her iki mutasyon da aktive edilmiş protein C rezistansı ile ilişkili olarak tromboza eğilimi arttırmaktadır (94,95). Faktör V (FV) eksikliği ilk defa 1947'de Owren tarafından rapor edilmiş olup Parahemofili olarak adlandırılmıştır. Otozomal resesif kalıtımla nesilden nesile taşınmaktadır. Faktör V eksikliği trombotik bozukluklara yol açabildiği gibi hemorajik durumlara da yol açmaktadır (96).

A. Hemorajik Durumlar: Homozigot Faktör V eksikliği, Heterozigot Faktör V eksikliği, Kombine faktör V ve faktör VIII eksikliği ve Faktör V eksikliğinin yol açtığı diğer durumlar (kombine hemofili ve APC rezistansı) olarak sınıflandırılmaktadır.

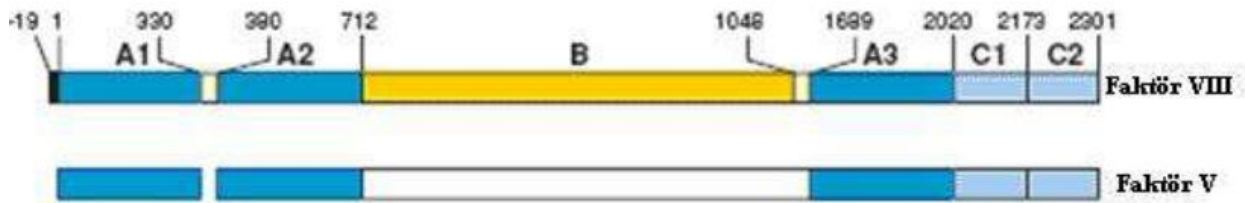
B. Trombotik Durumlar: Homozigot APC rezistansı, Heterozigot APC rezistansı, Heterozigot Faktör V eksikliği ve Heterozigot APC rezistansının kombinasyonu ve diğer

trombotik kombinasyonlar (APC rezistansı ve plazminojen eksikliğinin kombinasyonu) olarak sınıflandırılmaktadır.

FVIII pıhtılaşma sisteminde yeralan kendi başına proteolitik etki göstermeyen, fosfolipitlere ve Faktör IX'a bağlı bir kompleksin yapısında Faktör X'un aktivasyonunu hızlandıran bir kofaktördür.

İnsan Faktör VIII geni 1984 yılında Gitschier ve ark.'ları tarafından klonlanmıştır ve 186000 bp büyüklüğünde bilinen en büyük genlerden birisidir. X kromozomunun uzun kolu üzerinde Xq28 pozisyonunda lokalize olmakta ve 26 ekzondan oluşmaktadır. Faktör VIII dizisi 2332 aminoasitlik öncül bir proteini kodlamaktadır 14. ekzon bütün genin yaklaşık % 40'ını oluşturmaktadır. FVIII'in ekzonları arasında yer alan intronların büyüklüğü ise 200 bp (intron 17) ile 32,4 kb (intron 22) arasında değişmektedir. İtron 22, FVIII geni içerisindeki en büyük intron olmasının yanı sıra özel yapısıyla da önem taşımaktadır. İntronda FVIIIa ve FVIIIb olarak adlandırılan iki ek transkript bulunmaktadır ve FVIII proteininin yapımında rol almamaktadırlar. FVIIIa introna sahip değildir ve transkripsiyonu FVIII geninin tersine yönde olmaktadır ve her ikisinin kodladığı proteinlerin fonksiyonları henüz bilinmemektedir (97).

FVIII proteini kendini tekrarlayan domainli bir yapıya sahiptir. (A1-A2-B- A3-C1-C2) ve bu domainli yapı FV ile benzerlik göstermektedir. FV ve FVIII'in ağır ve hafif zincirlerinin % 40'ı identiktir.



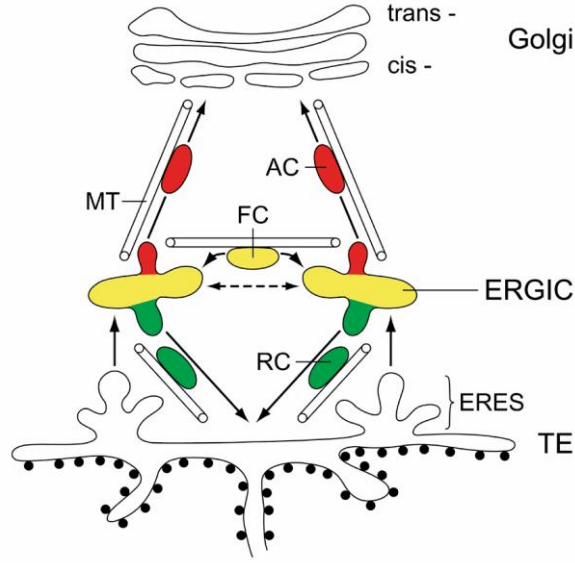
Şekil 2.9. FV ve FVIII Domain Yapısının Karşılaştırılması (Ohloff, 2001)

FVIII' in kalıtsal olarak eksikliği sonucu genetik geçiş gösteren ömür boyu süren kronik komplike bir pıhtılaşma bozukluğu olan hemofili A meydana gelir. FVIII geni içerisindeki değişik mutasyonlardan kaynaklanan hastalık bütün dünyada ve değişik ırklarda 1/10000 ortaya çıkmaktadır. Hemofili A hastası olan bireyler kanın pıhtılaşmasında rol oynayan

FVIII proteininin kanda ya normal düzeyinin altında olması ya da tamamen yok olmasından dolayı normal bireylerde görülenden daha uzun bir pıhtılaşma süresi göstermektedirler. Bu bireylerde asıl sorun dış kanamalardan çok eklem yerlerinde, kaslarda ve yumuşak dokularda meydana gelen iç kanamalardır. Faktör VIII geni ile hemofili A hastalığının bağlantısı açıkça ortaya konmuştur. Plazmadaki normal faktör düzeyleri %50-150 arasında değişir. Faktör düzeyi %0-1 arası olanlar ağır hemofili ; %1-5 arası olanlar orta hemofili; %5-30 arası olanlar ise hafif hemofili olarak değerlendirilmektedir. Antonorakis ve ark.'larının yaptığı çalışmada hemofili hastalarının yaklaşık %2' lik bölümünde FVIII geni içerisinde mutasyonlara rastlanmamıştır. Bu durum hemofili A hastalarında hastalığa yol açan başka lokusların varlığını gündeme getirmektedir (98).

Faktör V ve Faktör VIII kombine eksikliği (F5F8D) otozomal resesif geçiş gösteren orta derecede kanamalara yol açan bir hastalıktır. Bu hastalık ilk defa 1954 Oeri ve ark.'ları tarafından tanımlanmıştır. Milyonda bir görülen bu hastalığın kadın ve erkeklerde görülme sıklığı eşittir. Akraba evliliklerinin daha çok görüldüğü Ortadoğu ülkelerinde prevalansı yüksektir. Bu hastalık olguların çoğunda faktör V ve faktör VIII'in eksikliğinden çok, "*Endoplasmik retikulum–Golgi intermediate compartment*" (ERGIC-53) isimli hücre içi taşıyıcı proteinin eksikliği sonucu ortaya çıkar. Etkilenen homozigotlarda faktör V ve VIII düzeyi %5–30 arasındadır. ERGIC-53 lektin aktivitesine sahip hegzamerik bir membran proteini olup Faktör V ve Faktör VIII koagülasyon faktörleri ile kathepsin C ve Z'i içeren glikoproteinlerin endoplazmik retikulumdan (ER) golgiye transportunda rol oynar (99,100).

2.4.1. ENDOPLAZMİK RETİKULUM-GOLGİ INTERMEDIATE COMPARTMENT (LMAN1) GENİ



Şekil 2.10. ERGIC-53 ün rol aldığı yolak

(AC: ileriye taşınım, ERES: ER çıkış bölgesi, FC:hızlı taşıyıcı, MT: mikrotübül, RC: geriye taşınım, TE: taşınımı sağlayan yapı)

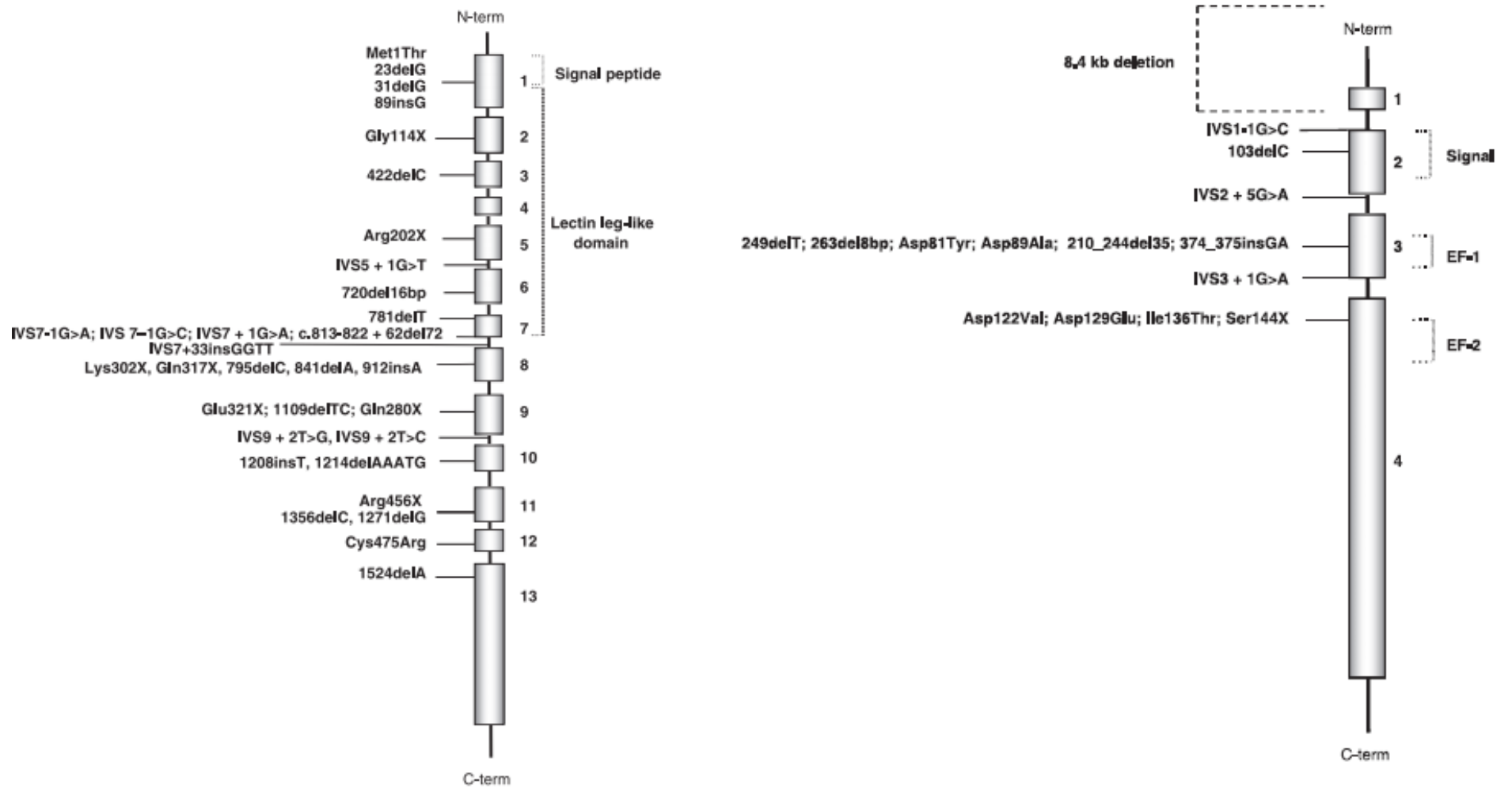
ERGIC-53 (LMAN1); ER'a glikoproteinlerin translokasyonundan sorumlu bir sinyal peptidine sahiptir. Bu peptid luminal, transmembran ve kısa sitoplazmik domain olmak üzere toplam 510 rezidüden oluşmaktadır. Luminal domain N- terminal karbonhidrat tanıma domaini (CRD)(31-285. rezidüleri arası) ve membran proksimal α helikal domain (290-460. rezidüleri arası) ve uç kısımda yer alan domain olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır (100).



Şekil 2.11. ERGIC-53 domain yapısı

ERGIC-53'de C terminal ucunda yer alan lizin ve fenilalaninden oluşan 507LysLysPhePhe510 dizisi ER' daki sinyalleri düzenlemede iş görmektedir. Hauri ve ark.'ları yönlendirilmiş mutagenез ile bu iki fenilalanin rezidüsünün ERGIC-53 vasıtasıyla koagülasyon faktörlerinin ER'den çıkışını sağladığını göstermişlerdir. Bu sinyaller luminal ve transmembran domainlerinin ERGIC-53 de intraselüler trafiği sağlamada birlikte çalışmasını sağlamaktadırlar (101). Vollenweider ve ark.'ları ise yaptıkları bir çalışmada rekombinant mutant ERGIC-53 de difenilalanin motifi yerine AlaAla motifini getirmişler bu mutantın ER' da birikimi ve geridönüşümü engellediğini görmüşler ve endojen normal ERGIC-53 üzerindeki dominant negatif etkiyi göstermişlerdir. Şimdiye kadar dilizin ve difenilalanin rezidülerinin uzaklaştırılmasıyla meydana gelen erken sonlanma ile ilişkili sekiz mutasyon tanımlanmıştır (102).

ERGIC-53 geni 'Lektin Mannose Binding Protein' (LMAN1) olarak da bilinir. Bu gen 18. kromozomun uzun kolunda 18q21 de lokalize olmuştur ve 13 ekzon içermektedir. Günümüze kadar 47 tane mutasyon tanımlanmıştır ve bunlardan en sık görülenleri c.86_89insG, p.R202X, c.822G>A, p.K302X mutasyonlarıdır.



Şekil 2.12. ERGIC-53 geninde tanımlanan mutasyonlar

2.4.2. MULTIPL COAGULATION FACTOR DEFICIENCY (MCFD2) GENİ

F5F8D hastalığından sorumlu diğer bir gen ise ERGIC-53 ile 1:1 kompleks oluşturan "Multiple Coagulation Factor Deficiency 2" (MCFD2) genidir. Bu gen de kargo reseptör görevi görerek FV ve FVIII'in ER'dan Golgiye transportunda görev almaktadır. 146 rezidüden oluşan bu küçük solubl protein 16kDa'luk sinyal peptidi aracılığıyla Ca⁺⁺ iyonlarının bağlanarak ER'dan golgiye taşınmasını sağlar. MCFD2 geni yaklaşık 19 kb dır ve 2. kromozomun kısa kolunda 2p21'de lokalize olmuştur, 4 ekzondan oluşmaktadır. Şimdiye kadar tanımlanan mutasyonların %70'i LMAN1 geninde bulunmaktadır çünkü FV-FVIII kombine eksikliği ile ilişkili çalışmaların başlangıcını bu gen oluşturmaktadır (Zhang et al,2003). MCFD2 geninde ise günümüze kadar 7 tane missense/nonsense, 2 tane küçük delesyon, 1 tane küçük insersiyon, 2 tane büyük delesyon, 3 tane splicing olmak üzere toplam 15 mutasyon belirlenmiştir. (HGMD)

Missense /Nonsense Mutasyonlar

CM082933	tGAT-TAT	Asp-Tyr	81
CM061108	GAT-GCT	Asp-Ala	89
CM073195	GAT-GTT	Asp-Val	122
CM031409	GACa-GAG	Asp-Glu	129
CM083542	aTAC-AAC	Tyr-Asn	135
CM031410	ATT-ACT	Ile-Thr	136
CM082932	TCA-TGA	Ser-Term	144

Büyük Delesyonlar

CG073868	35 bp c.210_244 (described at genomic DNA level)
CG081069	8.4 kb incl. 5'UTR & ex. 1 (described at genomic DNA level)

Küçük insersiyon

CI083393	TGTTTGTG ¹²⁶ AGAgGATGATGACA	375
----------	--	-----

Splicing Oluşturan Mutasyonlar

CS068210	IVS1 as -1 G-C
CS031470	IVS2 ds +5 G-A
CS031471	IVS3 ds +1 G-A

Delesyonlar

CD031559	CCAGC ³³ TTCTCcCAACCCGGCA
CD031560	ATGAT ⁴² TATGAtGGCAATAATT

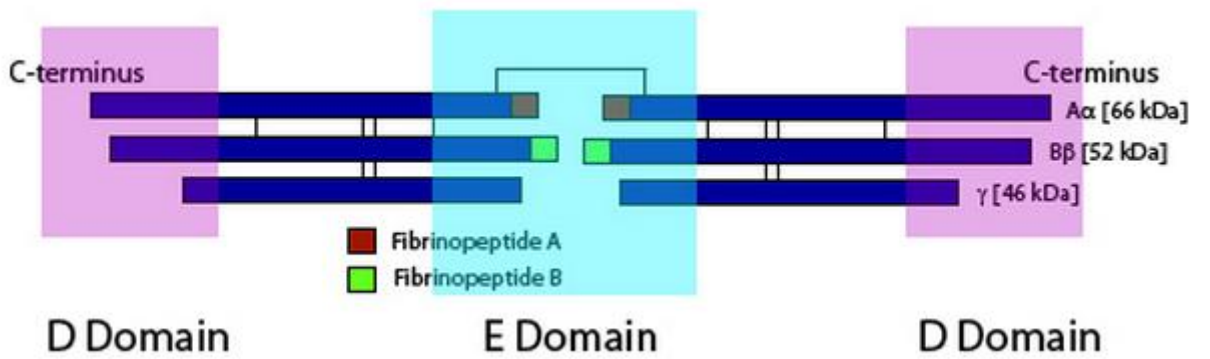
Şekil 2.13. MCFD2 geninde tanımlanan mutasyonlar

MCFD2' nin N terminal yapısı bilinmemekle birlikte C terminalinde 2 tane kalmodulin benzeri EF-hand domain yer almaktadır. EF hand domaini, Ca⁺⁺ bağlayıcı protein ailesinin bulunduğu heliks loop heliks yapısındaki domaindir. MCFD2 sinyalleri düzenlemekte, ER'da lokalize olmakta ve LMAN1 ile interaksiyona girmektedir.

MCFD2, LMAN1 den bağımsız olarak FVIII'e bağlanmakta ve glikolize etmektedir. Kawasaki ve ark'ları in vitro koşullarda MCFD2'nin LMAN1' in CRD domaini ile interaksiyona girdiğini HeLa hücre hattında (insan servikal kanser hücre hattı) hücrenin yüzey glikanlarının CRD'e bağlanmasının MCFD2' deki etkisini yaptıkları deneyde göstermişlerdir (103)

2.5. FİBRİNOJEN YAPISI

Fibrinojen karaciğerde sentezlenen, plazmada $160-400 \text{ mg/dL}^{-1}$ konsantrasyonda bulunan, 340 kDa ağırlığında bir glikoproteindir. Kanın pıhtılaşmasında meydana gelen fibrin'in öncü maddesi olan fibrinojen trombositlerin agregasyonu, pıhtı oluşumunda hemostatik dengeyi sağlamada önemli rol oynamaktadır. Fibrinojen hücre-matriks interaksyonu ile heparine, fibronektine, hücre adezyon moleküllerine bağlanmakta; anjiyogenezde, hücre proliferasyonunda, tümör gelişiminde, yaraların iyileşmesinde görev almaktadır (104). Fibrinojen disülfid köprüleriyle birarada tutulan ikili identik heterotrimerden oluşan büyük bir hegzamerik moleküldür. Simetrik yarı moleküllerin her biri 610 rezidüden oluşan 67kDa ağırlığında α zinciri, 461 rezidüden oluşan 57 kDa ağırlığında β zinciri ve 411 rezidüden oluşan 47kDa ağırlığında γ zincirinden oluşmaktadır. Fibrinojenin dış uçları 2α ve 2β zincirlerinin karboksi terminal uçlarından oluşup D domain olarak adlandırılmaktadır. Merkezi bölge ise tüm zincirlerin amino terminal uçlarından oluşmakta ve E domain olarak adlandırılmaktadır. α ve β zincir çiftlerinin amino terminal bölgelerinde 16 ve 14 aminoasitlerden oluşan fibrinopeptid A ve B kısımları bulunmaktadır (105).



Şekil 2.14. Fibrinojenin yapısı

α , β , γ zincirleri sırasıyla FGA, FGB ve FGG genlerini kodlamakta 4.kromozomda 50kb'lık bir bölgeyi kapsamaktadır. FGA geni 7.6 kb ağırlığında olup 6 ekzon içermekte, 3 farklı mRNA ürünü oluşturmaktadır: Transkriptin %90 ını 2.2kb'lık büyük $A\alpha$ zinciri oluşturmakta ve bu zincir 1-5. ekzonları içermektedir. Büyük α -E izoformu

ise sadece %1-2'lik kısmı alternatif splicing ile oluşturmaktadır ve bu kısım 5. ekzon , 5. intron ve 6. ekzonu içermektedir. Sonuçta splice'a uğramayan transkript 5.ekzon-intron ve 6.ekzonla büyük α zincirini kodlamayan FGA'ı meydana getirmektedir. FGB geni ise 8kb ağırlığında olup 8 ekzondan oluşmakta, 1.5kb'lık kodlama yapan diziyle birlikte tek 1.9 kb'lık transkripte sahiptir. FGG geni ise 8.5 kb ağırlığında olup 10 ekzon içermektedir. FGG geninde 2 mRNA transkripti alternatif splice mekanizması ile meydana gelmiştir: 1.3 kb'ı kodlama yapan diziden oluşan 1.6 kb'lık büyük m RNA parçası 10 ekzonu içermektedir ve büyük γ zincirini oluşturmaktadır bu zincir ya olarak bilinmektedir. Küçük parça ise γ' yada γ_b olarak bilinmektedir (106,107).

Konjenital fibrinojen defektleri afibrinojenemi ve hipofibrinojenemi içeren kantitatif veya Tip 1 eksiklikler ve Disfibrinojenemi ve hipodisfibrinojenemi içeren kalitatif veya Tip 2 eksiklikler olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır. Normal fibrinojen seviyesi plazmada $1.5-3.5 \text{ g.L}^{-1}$ olarak değişmektedir. Hipofibrinojenemi, Fibrinojenin plazmada 1.5 g.L^{-1} 'den az olması ile karakterize bir hastalık iken fibrinojenin tamamen olmaması ile durumu afibrinojenemi olarak bilinmektedir (108).

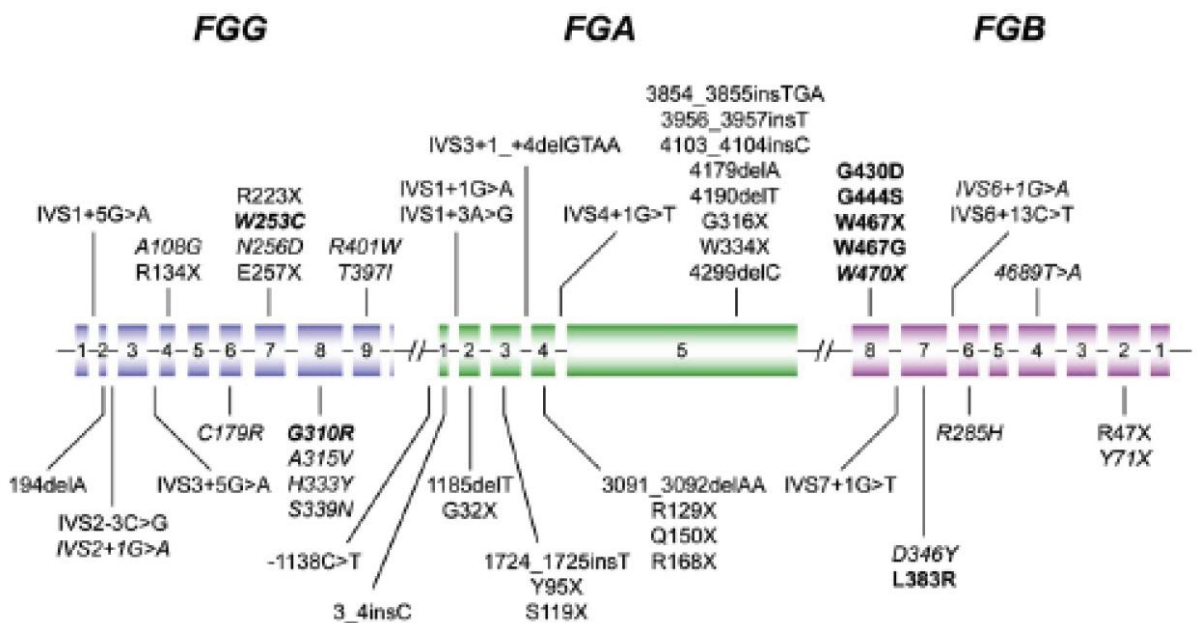
Disfibrinojenemi ise otozomal dominant kalıtım gösteren FGA,FGB,FGG genlerindeki herhangi bir mutasyon sonucunda fibrinojenin fonksiyonel yapısında değişime neden olarak fibrinopeptidlerin salınımının azalması veya tamamen yok olması, polimerizasyonun gecikmesi, trombine bağlanmanın azalmasına neden olan bir hastalıktır. Hipodisfibrinojenemi de yine aynı şekilde otozomal dominant kalıtım göstermekte fibrinojen molekülünün fonksiyon kaybı ile sonuçlanmaktadır. Günümüze kadar 400'den fazla disfibrinojenemi olgusu tanımlanmıştır. İlk kez 1968' de Blomback ve ark.'ları tarafından disfibrinojenemi mutasyonu tanımlanmıştır. Disfibrinojenemideki mutasyonların büyük çoğunluğunu üç fibrinojen geninin herhangi birindeki heterozigot missense mutasyonlar oluşturmaktadır (109).

Afibrinojenemi; ilk kez 1920'de iki Alman fizikçi Rabe ve Saloman tarafından tanımlanan otozomal resesif geçişli, hafif kanamalarla kendini gösterebildiği gibi yaşamı tehdit eden ciddi kanamalarla da ortaya çıkan fibrinojenin plazmada bulunmaması durumudur. İnsidansı milyonda bir'dir. 2010 verilerine göre dünyada görülen olgu sayısı 350 iken ülkemizde tanımlanan olgu sayısı 20 dir. Afibrinojenemi

çoğunlukla akraba evlilikleri sonucu ortaya çıkar (110). ‘Rare Inherited Coagulation Disorders (RICDs) verilerine göre fibrinojen eksikliğinden kaynaklanan hastalıklar en çok İran, İtalya ve Kuzey Amerika’da görülmektedir. Afibrinojenemi hastalarında kanama eğilim şiddetleri çeşitlidir. En çok görülen semptom umbilical cord (göbek bağı) kanamaları iken mukozal sistemdeki kanamalar, hemartrozlar (travmaya bağlı olarak eklem içine kan sızması) ve hematomlar da görülen diğer semptomlardır. Bu hastalığın trombotik yanına bakılacak olursa fibrinin trombin nötralize edici özelliklerinin eksikliğinde trombin tarafından tetiklenen invivo trombosit agregasyonu artmaktadır (111). Hipofibrinojenemi hastaları ise genelde travma ve cerrahiye bağlı kanamalarla orta derecede kanama paterni göstermektedirler. Fibrinojen eksiklikleri sadece kolagülasyon hastalıkları olarak bilinmelerine rağmen bazı hipofibrinojenemi hastalarında fibrinojenin hepatosit inkilüzyonları şeklinde biriktiği ve karaciğerde siroz’a neden olduğu Pfeifer ve ark.’ları tarafından gösterilmiştir (112).

2.5.1. Fibrinojen Eksikliklerinin Genetiği

FGA, FGB ve FGG genleri 4. kromozomun uzun kolu üzerinde q28 pozisyonunda lokalize olup genel yapıları ve genlerin kromozom üzerindeki yerleri 1985’de Kant ve ark.’ları tarafından tanımlanmıştır. Genler sırasıyla 644, 491 ve 437 aminoasit kodlamaktadırlar. FGA ve FGG genlerinin transkripsiyonu FGB geni ile karşılıklı oryantasyon göstermektedir.

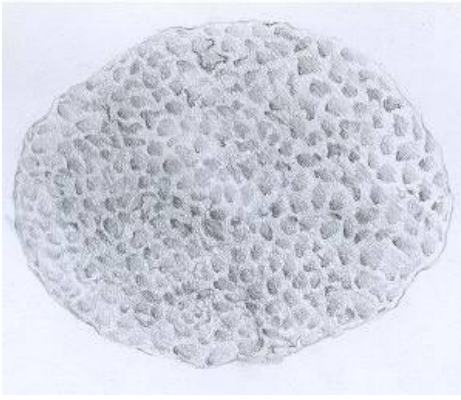


Şekil 2.15. Fibrinojen genlerinde tanımlanan mutasyonlar

Genlerdeki mutasyonların dağılımına bakılacak olursa ‘’ Human Gene Mutation Database’’ (HGMD) verilerine göre FGA geninde 45 missense/nonsense mutasyon olmak üzere toplam 87 mutasyon; FGB geninde 39’u missense/ nonsense mutasyon olmak üzere toplam 54; FGG geninde ise 63’ü missense/nonsense mutasyon olmak üzere 77 mutasyon tanımlanmıştır. Toplamda mutasyonların % 46’sı FGA geninde, %29’ u FGB geninde; %25’ i FGG geninde tanımlanmıştır. (113).

2.6. DEV TROMBOSİT SENDROMU (MAKROTROMBOSİTOPENİ)

Trombositler megakaryositlerin sitoplazmik parçalanmaları ile oluşan, ortalama 7-10 günlük ömürleri olan 2-3µm çapında küçük disk şekilli hücrelerdir. Megakaryositlerin parçalanması ve trombositlerin oluşumu çeşitli aşamalarda yeralan çok sayıda sitokin tarafından düzenlenmektedir. Trombopoietin trombosit oluşumunun temel düzenleyicisidir. Trombositler biri normal dolaşımda bulunan dinlenme evresindeki trombositler diğeri ise aktif halde bulunan trombositler olmak üzere iki formda bulunmaktadır (114).



Dinlenme evresindeki trombosit



Aktif halde bulunan trombosit

Şekil 2.16. Trombositler

Normal koşullar altında trombositler diğerk trombositlerle ya da damar endoteli ile etkileşmeden serbestçe kan damarında dolaşmaktadırlar. Damarda endotelde bir zedelenme olması durumunda trombositlerin adhezyon, aktivasyon, agregasyon ve sekresyon olmak üzere pıhtı oluşumuna neden olan bir seri olaylar zinciri tetiklenmektedir.

Kalıtsal trombosit hastalıkları trombosit sayı eksikliği ve/ veya fonksiyon bozuklukları sonucu koagülasyonda primer hemostaz aşamasını etkileyen ailesel geçiş gösteren bir grup hastalığı içermektedir. Otozomal dominant, otozomal resesif, X'e bağlı kalıtım gösteren bu hastalıkların toplumda görülme sıklığı kesin olarak bilinmemektedir. Trombosit sayımı direk gözle veya tam kan sayım cihazları ile yapılmaktadır.

Yetişkinlerdeki normal trombosit sayısı $150-450 \times 10^9/L$ dir. Trombositopeni ise bu değerin $150 \times 10^9/L$ altında olmasıdır. Kalıtsal trombosit hastalıkları; trombosit sayı bozuklukları, ağır trombosit fonksiyon bozuklukları, reseptör sinyal iletiminde bozukluklar, trombosit granül bozuklukları ve fosfolipid bozuklukları olarak sınıflandırılmaktadır (115,116) .

Çizelge 2.2. Kalıtsal trombosit hastalıklarının sınıflandırılması

I. Trombosit Sayı Bozuklukları	III. Reseptör ve Sinyal İleti Bozuklukları
1. MYH9 ile ilişkili bozukluklar	1. Trombosit Siklooksijenaz Eksikliği
2. Konjenital amegakaryosit trombositopeni	2. Tromboksan Sentaz Eksikliği
3. Trombositopeni-Radius Yokluğu Sendromu	3. Tromboksan A2 Res. Eksikliği
4. X-Geçişli Trombositopeni ile Diseritropoz	4. ADP Reseptör Eksikliği
5. Lösemiye yatkınlık ile seyreden Trombositopeni	
6. Montreal Trombosit Sendromu	IV. Trombosit Granül Bozuklukları
7. Akdeniz Makrotrombositopenisi	A. Dense Granül Bozuklukları
II. Ağır Trombosit Fonksiyon Bozuklukları	B. α - Granül Bozuklukları
1. Wiskott Aldrich Sendromu	V. Fosfolipid Bozuklukları
2. Glanzmann Trombastenisi	1. Scott Sendromu
3. Bernard Soulier Sendromu	

Trombositlerdeki bir anormallik ya da bozukluk trombositopati olarak bilinir ve bu anormallik/bozukluk trombositlerin düşük sayıda olmasıyla karakterize olan trombositopeni veya fazla sayıda olmasıyla karakterize trombositozis olarak bilinir. Makrotrombositopenide ise trombositlerin hemen hemen tamamı birbirine yakın büyüklükte olup eritrosit boyuna ulaşmışlardır. Dev trombosit sendromu da makrotrombositopeni, minör kanama ve nötrofilik inklüzyon cisimciklerinin varlığı ile karakterize otozomal dominant geçiş gösteren bir hastalıktır.

2.6.1. MYH9 İle İlişkili Bozukluklar

MYH9 ile ilişkili bozukluklar otozomal dominant geçiş gösteren May-Hegglin anomalisi (MHA), Sebastian sendromu (SBS), Fechtner sendromu (FTNS) ve Epstein sendromu (EPTS) gibi dev trombosit sendromlarının non muscle miyozin heavy chain IIA (NMMHC IIA) proteinini kodlayan miyozin ağır zincir 9 (miyozin heavy chain 9-

MYH9) geninde mutasyonlar sonucu farklı klinik bulgular ile gelişmektedir. Proteinin farklı doku ve organlarda sentezlenememesi sonucu non hematolojik bulgulardan işitme kaybı, katarakt, nefritis (böbrek iltihabı)de görülebilmektedir (117). MYH9 ilişkili hastalıkların ayırımında Alport Sendromu kullanılmaktadır. Bu sendrom İlk kez Dr. Arthur Cecil Alport tarafından 1927 yılında tanımlanmıştır (118).

- a. May- Hegglin Anomalisi: Makrotrombositopeni ile karakterize, kas dışı miyozin tip IIA'nın kümelenmesiyle oluşan lökosit inklüzyonlarına sahip nadir görülen dev trombosit sendromudur (119).
- b. Sebastian Sendromu: 1990 yılında Greinacher ve ark.'ları tarafından tanımlanan bu sendrom dev trombositlerle ve inklüzyon cisimcikleri ile karakterizedir (OMIM 605249).
- c. Fechtner sendromu (FTNS) ve Epstein sendromu (EPTS): Fechtner sendromu, Alport sendromunun bir varyantı olarak rapor edilmiştir. Alport sendromu ile böbrek iltihabı, sensorinöral işitme kaybı ve göz anormalliklerinin üçlü grubunu paylaşmaktadır ve makrotrombositopeni ve Döhle benzeri cisimcikler denen polimorf nüveli lökosit inklüzyonlarının ek özelliklerini sunmaktadır. Epstein sendromu, katarakt ve granülositte Döhle benzeri cisimciklerin olmaması ile Fechtner sendromundan ayrılmaktadır (117).

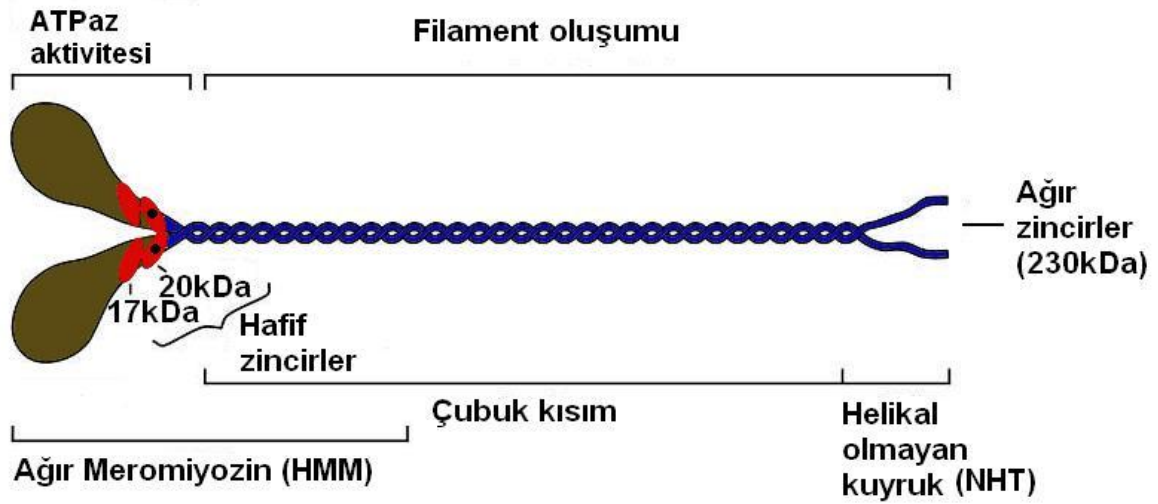
MYH9 genindeki mutasyon sonucu oluşan bu 4 makrotrombositopeninin laboratuvar ve klinik özellikleri tablodaki gibi özetlenebilir:

Çizelge 2.3. Makrotrombositopeninin laboratuvar ve klinik özellikleri

Kliniksel özellik	May-Hegglin Anomalisi	Sebastian Sendromu	Fechtner sendromu	Epstein Sendromu
Makrotrombositopeni	Var	Var	Var	Var
Lökosit İnküzyonu	Var	Var	Var	Yok
İşitme Sorunu	Yok	Yok	Var	Var
Böbrek İltihabı	Yok	Yok	Var	Var

Filogenetik olarak 17 sınıfta gruplandırılan miyozinlerin ikinci sınıfını, sarkomerik miyozinleri, düz kas miyozinleri ve kas dışı miyozinleri oluşturmaktadır.(Hodge and Cope 2000) Kas dışı miyozin ağır zincirinin NMHC-IIA, NMHC-IIB ve NMHC-IIC olmak üzere üç farklı izoformu bulunmaktadır ve bunlar sırasıyla *MYH9*, *MYH10* ve *MYH14* genleri tarafından kodlanmaktadır (120).

Kas dışı miyozinler biri dışarıda düzenleyici hafif zincir (20kDa) diğeri içeride temel hafif zincir (17kDa) olmak üzere iki hafif zincirden ve homodimer haldeki 230kDa'lık ağır zincirden oluşmaktadır. Kas dışı miyozin II molekülü, amino terminal ucunda globüler baş bölgesi ve helikal olmayan karboksi terminal ucu ile sonlanan çift kıvrımlı koldan oluşmaktadır. İki tane globüler baş, çift sarmal alfa helikal yapıda sarmal oluşturmuş çubuk fragmentini takip etmektedir. Çubuk fragmentindeki aminoasit dizisi, yan yana gelmiş iki α -heliksin arasında oluşan hidrofobik etkileşimler ile tekrar eden yedi rezidü ile karakterizedir. Helikal olmayan kuyruk bölgesi her üç kas dışı miyozin izoformunda da çift sarmallı çubuk kısmını takip eder. Bu bölge üç izoform arasında değişik amino asit dizisi göstermektedir (121,122).



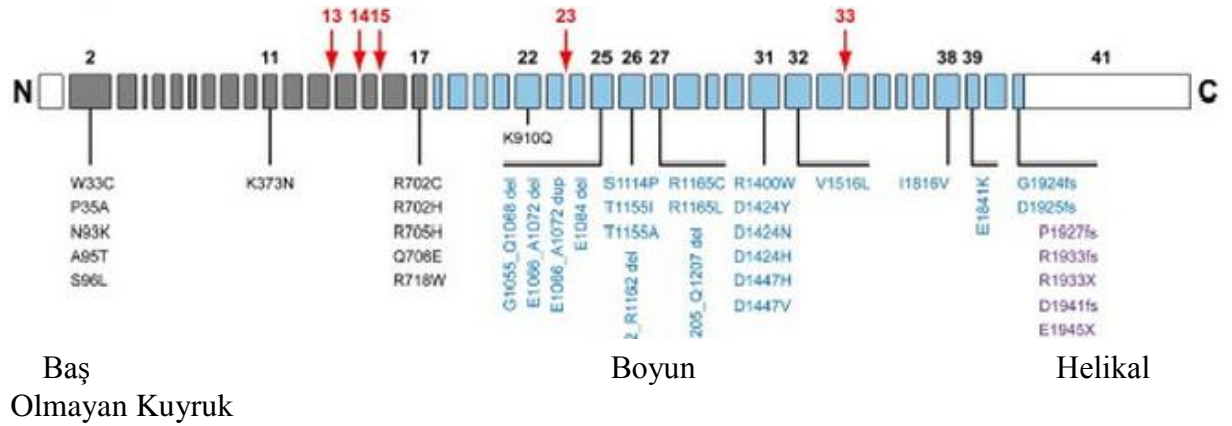
Şekil 2.17. Kas dışı miyozinin yapısı (Verkhovsky et al,1995)

Adelstein ve ark.'ları kas dışı miyozin II'nin aktivitesini aktifleştiren kritik basamağı; miyozin hafif zincir basamağı üzerindeki serin (Ser¹⁹) fosforilasyonu olarak göstermişlerdir (123).

2.6.2. MYH9 Geni

Kas dışı miyozinlerde 5.8kb'lık m RNA transkriptine sahip, NHMC-IIA sınıfının kodladığı MYH9 geni 40 ekzon içermektedir ve 22. Kromozomun uzun kolunda 22q13.1 lokalizasyonunda yer alan bir gendir. Gende şimdiye kadar 27' si missense mutasyon olmak üzere toplam 38 tane mutasyon tanımlanmıştır.

(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=MYH9>). 1,10 ve 16. ekzonlar ATP globüler baş domaini ve boyun kısmını kodlarken 24-26, 30, 31, 37,38 ve 40. ekzonlar ise kuyruk kısmını kodlamaktadır.



Şekil 2.18. MYH9 geninde tanımlanan mutasyonlar

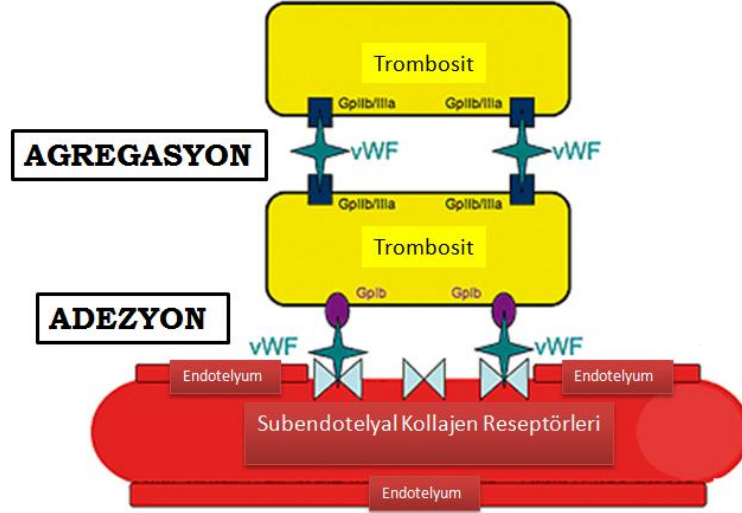
Şimdiye kadar 20 farklı hastalığın MYH9 genindeki mutasyonlarla ilişkili olabileceği ve bu hastalıkların fenotipik özelliklerinin 6 farklı klinik belirti ile ortaya çıktığı gösterilmiştir. Net bir şekilde genotip fenotip korelasyonu bilinmemesine rağmen farklı bireylerde bazı mutasyonların ((p.Glu1841Lys, p.Arg1933X, p.Asp1424Asn, p.Asp1424His, p.Arg1165Leu, p.Arg1165Cys) hematolojik belirtilerle, bazılarının ise Alport sendromuna benzer belirtilerle (Thr1155Ile, Asn93Lys, Lys371Asn, Ala95Thr, Asp1424Tyr, del Leu1205-Gln1207; ve 3 tane çerçeve kayması şeklindeki mutasyonlar: 5779delC, 5774delA, 5828delG) ortaya çıktığı görülmüştür.

Çalışmanın bu bölümünde makrotrombositopeni (dev trombosit sendromu) tanısı almış hastalarda MYH9 (Myosine Heavy Chain Gene) gen taraması yapılmıştır.

2.7. GLANZMANN TROMBASTENİ SENDROMU

Trombosit fonksiyonlarından biri olan agregasyon aşamasında meydana gelen bozukluklardan biri de Glanzmann Trombastenisi'dir. Glanzmann trombastenisi (GT), ilk olarak 1918 yılında Dr. Eduard Glanzmann tarafından herediter hemorajik trombastenisi olarak tanımlanmış anormal pıhtı reaksiyonu ve periferik yaymada trombositlerin küme yapmayıp tekli görünüşleri erken tanısal kriter olarak belirlenmiştir (124). 1956 yılında ise Braunsteiner ve ark.'ları trombosit fonksiyon bozukluklarını incelemişler ve trombastenileri kalıtsal hastalıklar grubuna dahil etmişlerdir (125). 1964 yılında Caen ve ark.'ları trombosit agregasyonunun olmadığı 15 Fransız olgu tespit etmişler ve bunu GT için primer tanısal özellik olarak belirtmişlerdir. Bu çalışmalardan sonra GT iki grup altında toplanmıştır : I. Grup trombosit agregasyonunun ve pıhtı retraksiyonunun olmadığı olgular iken agregasyon olmamasına rağmen rezidüel pıhtı retraksiyonu olan olgular ise II. Grubu oluşturmaktadır (126).

GT, otozomal resesif kalıtım gösteren, nadir görülen bir trombosit işlev bozukluğu olup hastalığın görülme nedeni trombosit membran glikoproteini olan glikoprotein IIB-III A'nın (α IIB β 3 integrin) yapısındaki nitelik ve nicelik değişimleridir. GpIIB/III A kompleksinin eksikliği veya fonksiyon bozukluğundan kaynaklanan GT de ADP, kollajen, epinefrin, trombin ve diğer ajanlarla trombosit agregasyonu olmamaktadır. Trombositler uyarıldığında yüzeylerinde yer alan GpIIB/III A kompleksinde bir değişiklik meydana gelmekte bu durum von Willebrand faktör (vWF), vitronektin, fibronektin ve fibrinojenin bağlanması için bölgelerin açığa çıkmasına neden olmaktadır. vWF ya da fibrinojen birden fazla trombosit GpIIB/III A kompleksi arasında çapraz bağları meydana getirmekte ve hasarlı bölgede trombosit tıkaçının oluşumunu sağlamaktadır. Daha sonra GpIIB/III A'nın sitoplazma içine uzanan kısmı iskelet sistemi ile etkileşime girmekte ve böylece fibrin pıhtısının kasılması ile pıhtı retraksiyonu gerçekleşmektedir. Ayrıca GPIIB/III A endotel tabakasının altında yer alan vWF ve fibronektine de bağlanarak adezyon oluşturan trombositlerin artmasını sağlamaktadır (127,128).



Şekil 2.19. Trombositlerin fonksiyonu

Hastalığın klinik seyrine bakılacak olursa; GT tanısı almış hastalarda trombosit sayısı, hacmi ve yaşam süresi normal iken, trombositlerin agregasyon yeteneği bozulduğu için kanama diyatezi bulguları ortaya çıkmaktadır. Klinik olarak hastalarda genellikle diş eti kanamaları, epistaksis, gastrointestinal sistem kanamaları ve menoraji sıklıkla görülmektedir (129). GT tanısında agregometre cihazıyla trombositlerin değerlendirilmesi yapılmakta ve akimsitometri yöntemi kullanılarak hastalık tiplendirilmektedir. Yapılan araştırmalar GT’de trombositlerin agregometrede ristosetin denilen bir antibiyotik haricinde hiçbir madde ile etkileşim sonrasında çökme yapmadığını ortaya koymuştur. Akım sitometri çalışmalarında ise GpIIB ve GpIIIA düzeyleri CD41 ve CD61 monoklonal antikorları kullanılarak belirlenmektedir. Bu belirlemelere göre GT, üç alt tipe ayrılmaktadır: GP düzeyi normalin % 5’ inden az olan olgular tip I, % 5-20 arasında olan olgular tip II olarak sınıflandırılmaktadır. Tip III varyantında ise GP düzeyleri normal veya normale yakın olmakla beraber reseptörlerin fonksiyonunda bir bozukluk söz konusudur. Bu tip GT hastalarında trombosit fonksiyonları normal olup kanama görülmemektedir, meydana gelen aminoasit değişimleri integrini fonksiyonsuz hale getirmektedir.

Irak Yahudileri gibi etnik gruplarda Tip I olguların sık görüldüğü, Japonya’da ise Tip II olguların fazla görülmesi yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (130). Akraba evliliklerinin sık görüldüğü Hindistan, Arabistan, İran’da hastalığın çok sık görüldüğü bilinmesine rağmen ülkemizde şimdiye kadar tanımlanan olgu sayısı, hastalığın

insidansı net olarak bilinmemektedir. Konuyla ilgili 2000 yılında yapılan bir araştırmada GT tanısı almış 177 hasta tanımlanmış ve bu hastalarda akraba evliliği oranı % 67 bulunmuştur. İnsidans araştırmasıyla ilgili en son çalışma da 2009 yılında yapılmış ve hastalar arasında akraba evlilik oranı %87.5 bulunmuştur (131).

Ağır trombosit fonksiyon bozukluğu ile ilişkili bir diğer hastalık Bernard Soulier sendromudur. Bu sendrom hafif dereceli bir trombositopeni olup periferde dev trombositlerle karakterizedir ve otozomal resesif kalıtım göstermektedir. Bu hastalığa sahip kişilerin trombositleri; zedelenen damarın subendotel tabakasındaki ya da plazmadaki vWF ile ristosetin eklendiğinde reaksiyon vermemekte böylece primer hemostaz oluşmamaktadır (132). vWF trombosit yüzeyine iki ayrı reseptöre bağlanmaktadır:

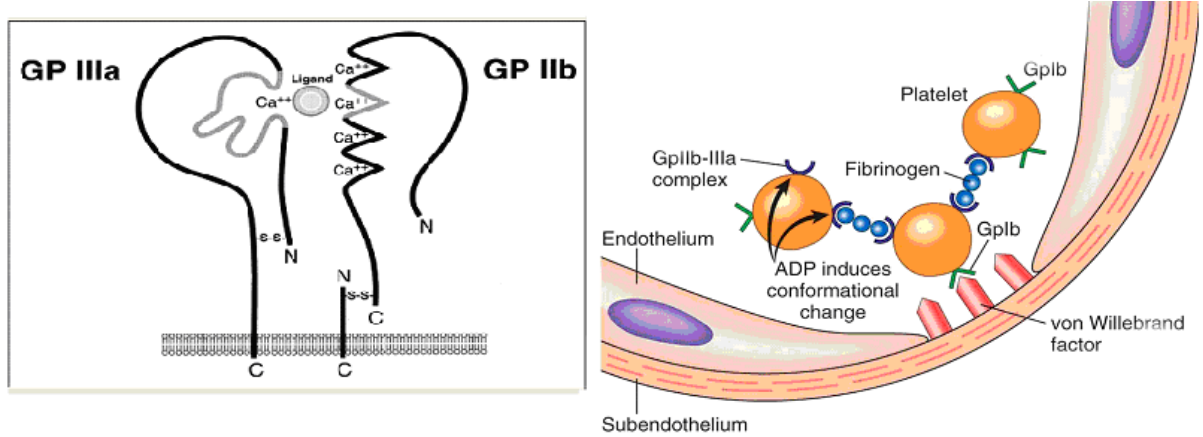
- a. Ristosetin varlığında trombositlerin ana adhezyon molekülü olan Glikoprotein IB'ye
- b. Trombositler, trombosit antagonistleriyle uyarılınca GpIIB-IIIa kompleksine bağlanmaktadır.

Bernard Soulier sendromu ilk kez 1969 yılında Grottum ve Solum tarafından genç bir hastada uzun kanama zamanı, trombositopeni ve oldukça büyük trombositlerin varlığı ile açıklanmıştır (133).

2.7.1. Glanzmann Trombasteni Genetiği

GT ile ilişkili genler Glikoprotein IIB (GpIIB /ITGA2B) ve Glikoprotein IIIA (GpIIIA/ITGB3) olarak belirlenmiştir. GpIIB/GpIIIA kompleksi integrin ailesinden olup hücre-hücre ve hücre-matriks interaksiyonunu sağlayan heterodimerik bir reseptördür. Bu reseptörler ekstraselüler reseptör proteinleri ile üst üste çakışır ve bu bağlanma Arg- Gly-Asp içeren sentetik peptidler tarafından inhibe edilmektedir. Northern Blot analizleri ve değişik immünolojik çalışmalar GpIIB' nin sadece trombositlerde eksprese olurken GpIIIA'nın α alt biriminin vibronektin reseptörüyle kompleks oluşturarak diğer dokularda da eksprese olduğunu göstermiştir (134). GpIIB ve GpIIIA genleri 250 kb ağırlığında olup 17. kromozomun uzun kolunda 21.31-32 pozisyonunda lokalize olan genlerdir. GpIIB, 30 ekzondan oluşan büyük bir gen iken,

GpIIIa 8 ekzonlu daha küçük bir gendir. GpIIB; α zincirini kodlarken GpIIIB; β zincirini kodlamaktadır. α zinciri 140kDa ağırlığında olup disülfid bağları içerirken kodladığı aminoasitlerin %30-70'i benzerdir. β zinciri ise 95 kDa ağırlığındadır ve sisteince zengin domainler içermekte olup aynı şekilde aminoasit homolojisine sahiptir. Trombosit plazma membranında yer alan GpIIB/GpIIIa kompleksinin yapısına bakılacak olursa yüksek oranda glikolizasyona uğramış bu reseptörlerin yapısında Ca^{++} bağlayıcı domainlerin olduğu ve bu bağlanma ile Ca^{++} 'ların GpIIB-IIIa'nın fonksiyonunu sağladığı gösterilmiştir. GpIIB-GpIIIa solubl haldeki fibrinojene bağlanmaktadır. Bunu trombositler ADP, trombin, kollajen gibi ajanlarla aktive olduklarında şekil değiştirmekte GpIIB-GpIIIa kompleksi aktive olmakta, solubl fibrinojen ve von Willebrand Faktör için reseptör olarak iş görmekte ve fibrinojen aracılı trombosit aktivasyonu yüzeydeki GpIIB- GpIIIa molekülleri ile sağlanmaktadır. Fibrinojen aracılı bu aktivasyon GpIIB/GpIIIa'nın α zincirinde karboksi terminalinde yer alan sadece fibrinojende bulunan onikili peptid - HHLGGAKQAGDV – sayesinde olmaktadır.



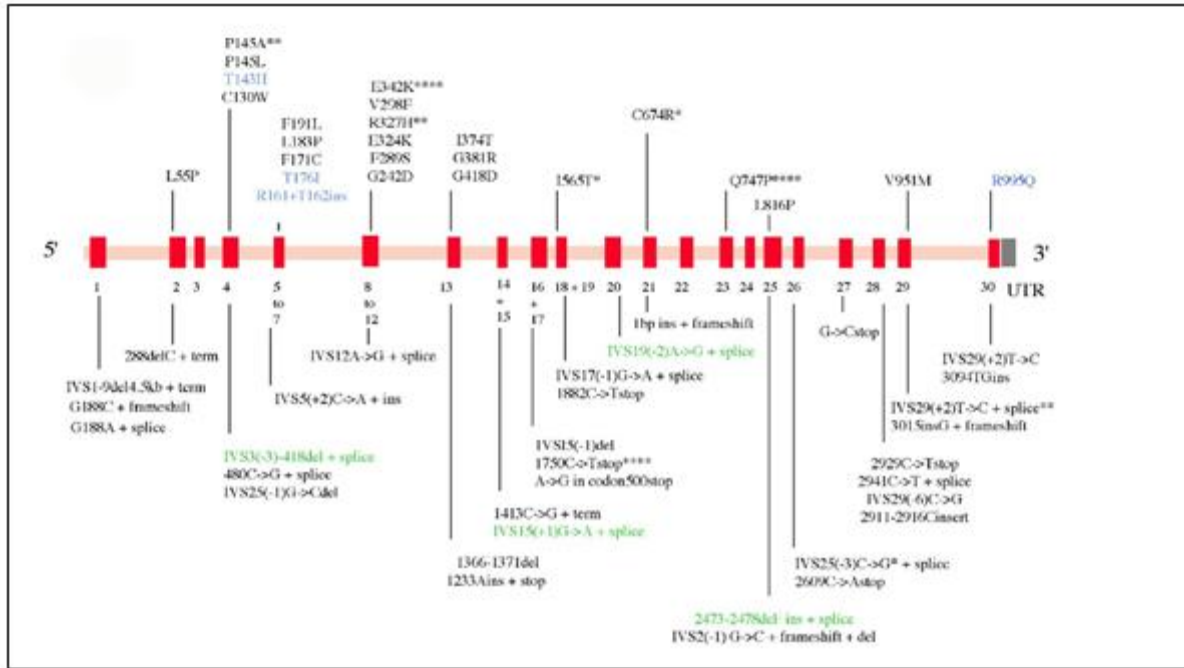
Şekil 2.20. GpIIB/IIIa reseptörlerinin yapısı ve fonksiyonu (135)

GT hastalığı GpIIB veya GpIIIa genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu trombosit membran proteinlerindeki kalitatif ya da kantitatif değişimler sonucu ortaya çıkmaktadır. GpIIB (ITGA2B) geninde şimdiye kadar 151 mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonların 63 tanesini missense (yanlış anlamlı) mutasyonlar oluşturmaktadır. Şimdiye dek tanımlanan tekli nükleotid değişimlerinin ekzonlarda olduğu ve sonucunda da missense ve nonsense mutasyonlarla aminoasit seviyesinde değişimlere yol açarak normal boyutlarda fonksiyonel olmayan veya kesilmiş proteinleri ürettikleri görülmüştür.

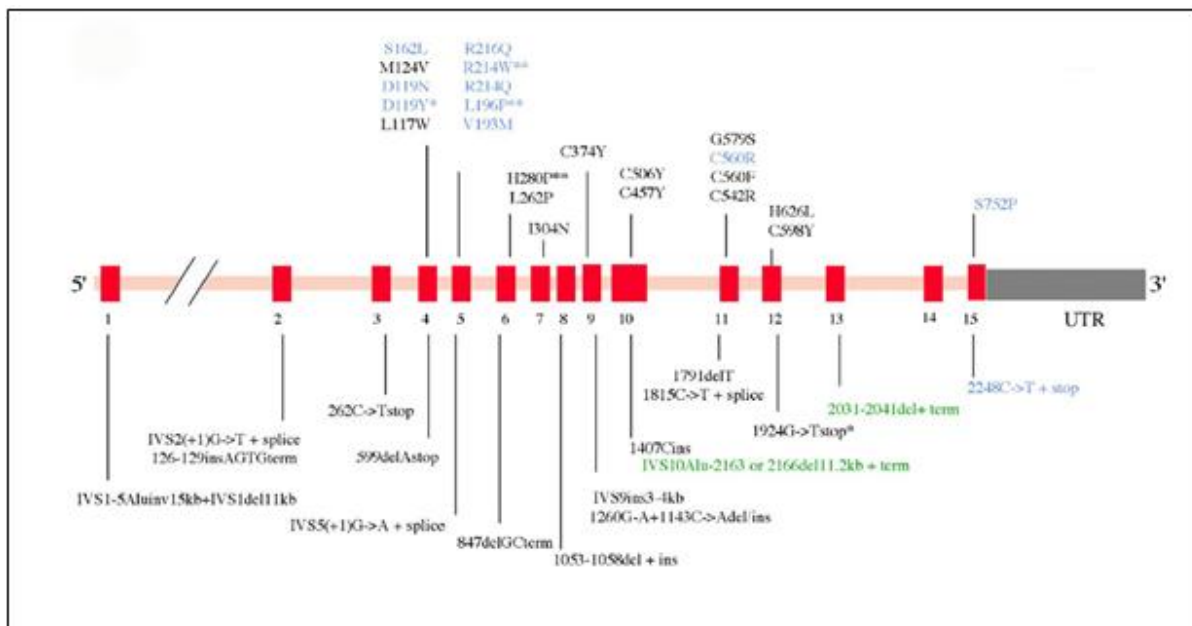
(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=ITGA2B>)

GPIIIB (ITGB3) geninde ise toplam 92 mutasyon tanımlanmıştır ve bu mutasyonların büyük oranını (59 tane) missense ve nonsense mutasyonlar oluşturmaktadır. Bu gende ilk tanımlanan mutasyon İsrail ve Arap populasyonlarında yapılan bir araştırmayla ortaya konulmuştur. Bu araştırmada 4.ekzonun splice bölgesinde meydana gelen 13 bç'lik bir delesyonun GpIIB proteininde posttranslasyonel gelişimde kritik rol oynadığı gözlemlenmiş, bu durumun membranda kompleksin ekspresyonunun azalmasına yol açtığını ortaya koymuştur (137). GpIIIA geninde yapılan ilk çalışmada ise Irak Yahudilerinde yapılmış, genin 13.ekzonunda meydana gelen 11bç'lik delesyonun frameshift (çerçeve kayması) mutasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu durumun GpIIIA'nın membrana girişini önlediği, transmembran domaininden önce protein terminasyonuna neden olduğunu ve ekspresyonu engellediği bu çalışmayla gösterilmiştir.

Nadir görülen bir sendrom olan GT ile ilgili çalışmalardan en büyüğü Fransa'da yapılmıştır ve bu çalışmada yaklaşık 300 vaka çalışılmıştır, daha sonra D'Andrea ve ark.'larının İtalya'da yaptıkları bir araştırmada ITGA2B geninde 17, ITGB3 geninde 4 tane olmak üzere toplam 21 mutasyon tanımlanmıştır. Çalışmada mutasyonların stop kodonu oluşturmasıyla meydana gelen güdük proteinlerin ya da oluşan missense mutasyonların hastalarda kanama şiddetinde büyük farklılık gösterdiği saptanmıştır. Kısa bir süre sonra ise Güney Hindistanda 40 ailede yapılan bir araştırmada ITGA2B de 13, ITGB3 de 10 tane olmak üzere 23 yeni mutasyon gösterilmiştir. Aynı populasyonda 45 hastada yapılan araştırmada ise 22 yeni mutasyon gösterilmiştir. Bütün bu analizler sırasıyla % 62.2 oranında Tip I, %15.5 Tip II, %22.2 ise varyant tipte hastalık meydana geldiğini ortaya koymuştur.



Şekil 2.21. GpIIB geninde tanımlanan mutasyonlar (138)



Şekil 2.22. GpIIIA geninde tanımlanan mutasyonlar (138)

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Bu tez çalışmasında Türk popülasyonunda nadir görülen hematolojik hastalıklarda sık görülen mutasyonların ortaya konulması ve ileride yapılacak çalışmalar için yol gösterici olması amaçlanmıştır. Literatürde daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında hematolojik hastalıklar kapsamında gen taramalarının hepsinin münferit çalışmalar olduğu görülmektedir. Bu çalışma popülasyonumuzda nadir görülen hematolojik hastalıklarda gen taramasının hepsinin birarada olduğu ilk çalışmadır.

4. MOLEKÜLER TEKNİKLER

4.1. Çözelti ve Solüsyonlar

Bu çalışmada DNA izolasyonunda kırmızı kan hücrelerini lize etmek için RBC lizis çözeltisi, fenol / kloroform karışımı; polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerini görmek için kullandığımız agaroz jeli hazırlamak için TBE (Tris- HCl Borik asit EDTA), TAE (Tris-HCl Asetik asit EDTA) çözeltileri, Tek İplikçikli Yapısal Polimorfizmi (SSCP) jeli hazırlamak için akrilamid bisakrilamid çözeltisi, amonyum per sülfat çözeltisi ve N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin (TEMED) solüsyonları kullanılmıştır

4.2. DNA Ekstraksiyonu

DNA'lar, kan örneklerinden fenol/kloroform yöntemiyle ekstrakte edilmiş ve etanol (Tekel, Türkiye) ile muamele edilerek çöktürülmüştür.

4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) spesifik bir DNA dizisinin in-vitro ortamda çoğaltılması yöntemidir. İlk kez 1985 yılında Karry Mullis tarafından geliştirilen bu yöntem bir polimeraz enzimiyle gerçekleştirildiği için polimeraz zincir reaksiyonu adını almaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu, DNA klonlanmasını kolaylaştırarak, rekombinant DNA araştırmalarının güçlü bir tekniği olmuştur ve pek çok durumda konakçı hücrelerin kullanıldığı klonlamanın yerini almıştır. (139)

PCR, DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanır. Bu yöntemin uygulanabilmesi için çok düşük miktarda DNA bile yeterlidir. PCR ile belirli bir bölgeyi çoğaltabilmek için, hedef DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgiler gerekir. Bu bilgi, tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanacak olan iki oligonükleotid primerin sentezi için kullanılır. Primerler, çoğaltılacak tek zincirli DNA molekülündeki tamamlayıcı diziler ile hibridize olur. Isıya dayanıklı bir polimeraz, deoksinükleotid trifosfatları (dNTP; A, C, T, G) kullanarak çalışılan DNA'daki hedef bölgenin sentezini sağlar. Polimerazın çalışması için tampon görevi yapacak maddeler ve tuzlar (genellikle Tris ve KCl), ayrıca önemli olan bir kofaktör olan Mg^{++} iyonları gereklidir. (139). PCR reaksiyonu temel olarak üç aşamadan oluşmaktadır. Bunlar, DNA'nın yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon), sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyon), son olarak zincirin uzaması (polimerizasyon)'dur. Bu üç aşamaya bir PCR döngüsü denir ve çoğaltılacak ürün miktarı bu döngünün tekrar sayısına bağlıdır. Bu döngü sayısı genellikle 30-40 arasındadır. Oluşturulan DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir PCR işleminde "n" döngüsonunda kalıp DNA'nın istenilen bir bölgesi yaklaşık 2^n kez çoğaltılmış olur. İşlem ısı dönüştürücüsü (thermocycler) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklık koşulları belirlenen programlarla otomatik olarak gerçekleştirilir. Bu yöntemle; klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanılmak üzere bol miktarda hedef DNA parçaları elde edilir. (139,140). PCR reaksiyonunda ilk aşamada çoğaltılacak olan çift zincirli DNA 90-95°C'de yaklaşık 5 dakika ısıtılmak suretiyle denatüre olur ve tek zincirli hale getirilir. İkinci adımda sıcaklık 50-70°C arasında bir değere düşürülerek (bağlanma sıcaklığı) primerlerin tek zincirli DNA'ya bağlanması sağlanır. 15-30 nükleotid uzunluğunda olan yapay oligonükleotidlerden oluşan bu primerler; çoğaltılacak DNA'nın sınırlandırılması için başlangıç noktası ve bitiş noktası olarak görev yaparlar. Üçüncü aşama olan DNA sentezi aşaması ise 70-75°C sıcaklıkları arasında gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, nükleotidleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur (140).

PCR reaksiyonu için kullanılan DNA polimeraz enzimi *Thermus aquaticus*'dan izole edilen ısıya dayanıklı Taq polimeraz enzimidir. Enzim, yüksek ısılarda iyi çalışması ve hızlı DNA sentezi yapması nedeni ile tercih edilmektedir. PCR'dan iyi sonuç

alınabilmesi değişik faktörlere bağlıdır. Bu faktörler; reaksiyonun pH'ı, kullanılan oligonükleotidlerin hedef DNA'ya olan spesifikliği, sıcaklık değerleri ve reaksiyon için gerekli olan diğer kimyasal maddelerin konsantrasyonlarıdır. Taq DNA polimerazın iyi çalışabilmesi için en etkin olduğu pH'ın tüm uygulama boyunca korunabilmesi en önemli faktörlerdendir. Bu amaçla reaksiyonlarda son konsantrasyon 10 mM olacak şekilde Tris.HCl pH:8.4 tampon olarak kullanılmaktadır. PCR karışımında 50-60mM düzeyinde potasyum ve 100 µg/ml jelatin bulunmasının çoğalmayı önemli miktarda artırdığı saptanmıştır. Magnezyum (Mg); +2 değerlikli olup DNA polimeraz'ın çalışmasını sağlayan en önemli faktördür. Sahip olduğu pozitif yük sayesinde negatif yüklü DNA molekülleri arasına girerek oligonükleotidlerin DNA moleküllerine bağlanmasını kolaylaştırır. DNA, dNTP ve proteinlerin tümü magnezyum (Mg) iyonlarına bağlandığı için her PCR reaksiyonunda Mg konsantrasyonu ampirik olarak ayarlanmalıdır. Fazla Mg miktarı Taq DNA polimeraz enziminin spesifikliğini azaltırken, az miktarda olması enzim aktivitesini düşürür ve enzim inaktivasyonuna yol açar (139).

Reaksiyonun gerçekteşmesi için gerekli bir diğer kimyasal dNTP'lerdir. Reaksiyon içerisindeki son konsantrasyonları dNTP başına 2 mM olacak şekilde kullanılmalıdır. Reaksiyon sırasında ortamda dTTP, dCTP, dATP ve dGTP'nin konsantrasyonlarının eşit olması doğru ürün elde edilmesi açısından önemlidir. dNTP'nin az miktarda kullanımı oluşan PCR ürününün miktarının azalmasına; fazla miktarda kullanımı yanlış oligonükleotid eşleşmesi sonucu hedef DNA dışındaki bölgelerin çoğalmasına neden olur (140).

PCR spesifikliğinde oligonükleotidlerin uzunluğu önemli yer tutar. Optimal uzunluk yaklaşık 15-30 nükleotid olmalıdır. Oligoprimelerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı kabaca $T_m: 4(GC) + 2(AT)$ formülüyle hesaplanır. Bu değer oligonükleotidlerin nükleotid konsantrasyonlarına bağlıdır ve hesaplanan uygun sıcaklık değeri PCR spesifikliğini arttırmaktadır. Kullanılan oligonükleotidlerin nükleotid içerikleri rastgele ancak orantılı olmalıdır. Tekrarlayan diziler içermemeli, guanin sitozin oranı %50'yi geçmemelidir. Oligonükleotid dizisinin çoğaltılması hedeflenen DNA bölgesi içinde sadece bir kez bulunmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca, kullanılan oligonükleotid çiftinin uç bölgelerinde ve dizisi içerisinde birbirine uygunluk gösteren bölgeler bulunmamalıdır; aksi takdirde oligonükleotidin uç bölgeleri birbiri üzerine kıvrılarak ya

da uygunluk gösteren bölgeler birbirine bağlanarak PCR' in olumsuz etkilenmesine neden olur (140).

4.4. Tek İplikçikli Yapısal Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polymorphism) (SSCP)

Mutasyon belirlenmesinde kullanılan tekniklerden biri olan SSCP denatüre olmayan jellerde tek iplikli DNA'da oluşan değişimin, jelde yürüme farklılığının belirlenmesine dayanır. Bu yöntem ile nükleotit dizisinde mutasyon ya da polimorfizm sonucu oluşmuş tek baz değişikliklerini belirlemek mümkündür (139).

Tek zincirli DNA parçacığı bazı koşullarda nükleotit dizisine bağlı olarak belirli bir şekil alır. Bir baz değişimi DNA parçacığının konformasyonunun ve dolayısı ile elektroforetik hareket yeteneğinin değişmesine neden olur (140). SSCP ile mutasyon taraması yönteminde mutasyon taranacak DNA bölgesi önce PCR ile çoğaltılır. Çoğaltılan DNA molekülleri yüksek ısı ile çift iplikli halden tek iplikli hale getirilip, elektroforez jeline yüklenir. Poliakrilamid jel elektroforezinde göç hızlarına bakılarak sonuçlar değerlendirilir. Tek iplikli DNA'nın farklı bantlar göstermesi; mutasyon olabileceğinin göstergesidir.

SSCP tekniği aynı anda birçok örnekte mutasyon taramasını sağladığından moleküler genetik çalışmalarına hız kazandırmaktadır. Yöntemden en iyi şekilde sonuç alabilmek için, kullanılan PCR ürününün 100 bp'ni geçmemesi gerekmektedir. 200 nükleotitlik bir dizide %90'ın, 400 nükleotitlik bir dizide ise %80'lik bir oranda mutasyonları yakalama şansı vardır (139)

4.5. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi ya da "Sequencing" DNA'nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir. Nükleotid dizilerinin saptanmasında Maxam-Gilbert kimyasal degradasyon yöntemi ve Sanger dideoksi enzimatik yöntemi olmak üzere iki temel teknik geliştirilmiştir. Her iki yöntemde dizi analizi yapılacak DNA'nın hazırlanması, reaksiyonlar ve yüksek voltaj jel elektroforezi olmak üzere üç ana aşaması bulunmaktadır. Allan Maxim ve Walter Gilbert kimyasal degradasyon yönteminde dizisi belirlenecek DNA parçacığının komplementer zincirleri ayrılıp zincirlerden biri

kullanılır. Dizisi saptanacak zincir 5' ucundan polinükleotid polinükleotid kinaz enzimi kullanılarak radyoaktif fosfor ile işaretlenir. Bu işaretlenen DNA parçası dört örnek olarak bölünür. Her örneğe, DNA'da ki bazlardan birisini tahrip edecek şekilde bir kimyasal madde eklenir. Reaksiyon için kısıtlı bir süre verilerek her tüpte farklı pozisyonlardaki hedef nükleotidlerden kırılmış moleküller elde edilir. Sonuçta, kırıldığı noktaya göre, hepsi 5' ucundan işaretli ancak boyları farklı bir dizi parçacık elde edilir. Dört örnek karışımı daha sonra uzunluklarına göre elektroforetik olarak ayrılacakları poliakrilamid jel üzerinde, yan yana dört paralel kuyuya uygulanır. DNA parçalarının uçları radyoaktif olarak işaretli olduğu için otoradyografi ve elektroforez yöntemiyle sonuç alınır (141)

Dideoksi ya da zincir sonlanma reaksiyonu olarak bilinen Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleşmektedir. Dizisi saptanacak DNA zinciri yeni sentezlenecek DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır. Bu yöntem için dizisi belirlenecek olan DNA 'ya, dört farklı dNTPye, dört farklı ddNTPlere, reaksiyonu kataliz edecek DNA polimeraz enzimine ve serbest OH grubu içeren primere ihtiyaç vardır. İlk olarak analiz için kullanılacak kalıp DNA asimetrik amplifikasyon yöntemiyle hazırlanır. Böylece daha fazla kalıp DNA elde edilir. PCR'da olduğu gibi denatürasyon, yapışma, uzama sikluslarının belirli sayıda tekrarlanmasıyla gerçekleştirilir (138). Yöntemde kullanılan ddNTP'lerin 3' ucunda hidroksil (OH) grubu bulunmamaktadır. Bu durumda molekül yeni sentezlenen DNA'ya katılır ancak 3'-OH grubu taşımadığı için kendisine nükleotid ilave edilemez ve zincir sentezi sonlanarak bir DNA parçacığı elde edilir. Deneyde, dört reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir reaksiyon karışımı kalıp DNA zinciri, uygun primer, radyoaktif nükleotid trifosfatların dördü ve az miktarda ddNTP'den sadece birini içerir. Zincir sonlanması için dört reaksiyon tüpünde farklı bir ddNTP bulunur. Elektroforez sonrası DNA bantları otoradyografi ile görüntülenir. Bu bantlar yukarıdan aşağıya doğru okunarak dizi saptanır. (139)

Günümüzde DNA dizi analizi için Sanger'in enzimatik yöntemi esasına dayalı tam otomatik kapiller sistemli çalışan DNA dizi analiz cihazları, radyoaktif izotoplar yerine ise floresan boyalar kullanılmaktadır. (141) Sistem sahip olduğu lazer ışığı teknolojisiyle farklı özellikteki floresan boyaları algılar, her nükleotid için ayrı renkte bir pik oluşturarak nükleotid dizisini belirler.

5. MATERYAL VE YÖNTEMLER

5.1. MATERYAL

5.1.1.Çalışma Grubunun Oluşturulması

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya pediatrik stroke (inme), homosisteinüri ve nadir görülen hematolojik hastalıklar kapsamında yeralan afibrinojenemi, Faktör V-Faktör VIII kombine eksikliği, dev trombosit sendromu (makrotrombositopeni) ve Glanzmann trombasteni tanısı alan hastalar dahil edilmiştir. Bu hastaların kanları Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dallarında, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalı, İstanbul Şişli Etfal Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı ve Konya Selçuk Üniversitesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı ile TOBB-ETU Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları bölümünden laboratuvarımıza yollanmıştır. DNA'ları çalışılacak bireylerin çalışmaya dahil edilmelerine dair onam formları kendilerinden ve/veya ebeveynlerinden alınmıştır.

5.2. YÖNTEMLER

5.2.1 DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu klasik fenol- kloroform yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem kapsamında; hastaların kanları 1 cc 0,5 M EDTA'lı (Etilendiamintetraasetik asit, Sigma, ABD) tüpler içerisine 9 cc olarak alınır. 50 cc'lik falkon tüpe konularak üzerine (1/2,5 oranında) 25 cc RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorür (NH₄Cl) (Merck,Darmstadt, Almanya), 10 mM Potasyum Bikarbonat (KHCO₃) (Merck, Darmstadt, Almanya), 0,5 M EDTA] ilave edilerek 20 dk buzda bekletilir. +4°C, 4000 rpm'de 15 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edildikten sonra süpernatant dökülür, çökelek üzerine tekrar RBC lizis solüsyonu ilave edilir. RBC lizis solüsyonu ile yıkama işlemine tüm eritrositler lize oluncaya kadar yani pellet beyaz renk alıncaya kadar devam edilir. Kırmızı küreler elimine edildikten sonra geriye çekirdekli hücreler

olan lökositler kalır ve dipte kalan pelletin (lökosit) üzerine 1000 µL RBC lizis solüsyonu eklenir. Tüp iyice karıştırılarak pelletin üzerine eklenen solüsyon içerisinde iyice çözünmesi sağlanır. Bu karışımın 800 µL'si ependorf tüpüne alınarak -20°C'de stok olarak saklanır. Geriye kalan 200 µL bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 20 µg/ml olacak şekilde Proteinaz K enzimi (Quantum, Montreuil, Fransa), son konsantrasyonu %0,5 olacak şekilde de %10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat, Sigma, ABD) ve lökosit hacminin 2,5 katı kadar Nükleaz Tamponu [10 mM Tris-HCl pH: 7,5 (Tris Base, Owl Scientific, ABD-HCl, Merck, Almanya), 400 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Almanya), 2 mM EDTA ilave edilir, 56°C'lik su banyosunda (Nüve, Türkiye) bir gece bekletilir.

Ertesi gün 1:1 oranında Fenol/Kloroform 25:24:1 oranlarıyla sırasıyla; Fenol (Merck, Almanya):Kloroform (Merck, Almanya):İzoamilalkol (Merck, Almanya) ilave edilerek 10 dk boyunca elde iyice çalkalanır. 10 dk çalkaladıktan sonra 15 dk buza gömülü olarak bekletilir. Daha sonra +4°C, 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edildiğinde belirgin iki faz ayrılır. Üstteki faz yani süpernatant dikkatlice başka bir tüpe alınır ve üzerine miktarın 1/10'u oranında 2 M Sodyum Asetat (C₂H₃O₂Na) (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik alkol (Tekel, Türkiye) ilave edilir. Ependorf tüpü ters düz edilerek DNA'nın görünür hale getirilmesi sağlanır. Ardından tüp -20 °C'de bir gece bekletilir. Ertesi gün +4°C, 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edilir. Dikkatli bir şekilde süpernatant dökülür, DNA dipte pellet halindedir. Tüp ağzı açık 10 dk kurutulur. Kurutulan DNA 500 ml %70'lik etanol ile tekrar santrifüj edilir. Süpernatant dökülür ve tüpler kurutma kağıdı üzerinde kapakları açık bir şekilde kurumaya bırakılır. Alkol iyice uçtukten sonra yani etanol kokusu tümüyle gittikten sonra DNA üzerine TE solüsyonu (10 mM Tris-HCl ve 1 mM EDTA) eklenerek bir gece 37°C'lik su banyosunda bekletilerek çözülür. TE içerisinde çözünen DNA +4°C'de veya -20 °C saklanır.

5.2.2. DNA' nın Spektrofotometrik Analizi

DNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrofotometre (NanoDrop ND 1000, ABD) kullanılarak ölçüm yapılır. 260 nm DNA'nın, 280 nm proteinin ve 230 nm ise fenolün maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyudur. DNA'nın saflığı değerlendirilirken A260/A280 ve A260/A230 oranlarına bakılmaktadır. 260/280 oranının ~1,8 ve A260/ A230 oranının ise 1,8-2,2 olması DNA'nın saf olduğunu göstermektedir. Protein, fenol veya diğer kontaminantların varlığı durumunda ise oranlar farklılık göstermektedir.

5.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR ile genlerde hedeflenen bölgelerin çoğaltılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada pediatrik stroke hastalarında PCI (*SERPINA5*) geni, homosisteinüri hastalarda CBS geni, FV-FVIII kombine eksikliği görülen hastalarda ERGIC-53 ve MCFD2 genleri, afibrinojenemili hastalarda FBG geni, dev trombosit sendromlu hastalarda MYH9 geni, Glanzmann trombasteni tanısı alan hastalarda GpIIB ve GpIIIA genlerinin taranması gerçekleştirilmiştir. Bu genlerin PCR ile çoğaltılması için özgün primerler tasarlanmıştır. Primer tasarımı Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) programı kullanılmıştır. Tasarlanan primerlerin özgüllüğünün kontrolü için NCBI (National Center for Biotechnology) veritabanında yer alan Blast (<http://blast.ncbi.nlm.gov/Blast>) seçeneği kullanılmıştır. Primer-BLAST alt seçeneğinde yer alan forward-reverse (ileri-geri) primer çiftlerinin insan genomunda hangi bölgeleri çoğalttığının belirlenmesi ve hedef ampikonun dizisi ile kıyaslanmak suretiyle primerlerin özgüllüğü kontrol edilmiştir. Uygun primer çiftleri kullanılarak PCI geninde 5 ekzon , CBS geninde 18 ekzon, ERGIC-53 geninde 13 ekzon, MCFD2 geninde 5 ekzon, FBG geninde 8 ekzon, MYH9 ekzonunda 7 ekzon, GpIIB (*ITGA2B*) geninde 35 ekzon ve GpIIIA geninde 4 ekzonun amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir.

5.2.3.1. PCI (*SERPINA5*) Geni Mutasyon Analizi

PCI (*SERPINA5*) geninin 5 bölgesi için her biri 0.1 µg/ml konsantrasyonunda iki primer seti kullanıldı. PCR için kullanılan primer setleri ve erime sıcaklıkları aşağıdaki tabloda listelenmiştir:

Çizelge 5.1. PCI genine ait 5 ekzonun amplifikasyonu için kullanılan primer setleri

	Forward Primers	Reverse Primers	Erime Sıcaklığı
Exon1	5' CACAGTAAGTACCGATGCCG 3'	5' AGATGTCACTAACCCACC 3'	57
Exon2	5' GGGACATCTCTGGAAAGTCAG 3'	5' CCCCCTCTTTTATGTATGTGAG 3'	55
Exon3	5' TGICTTCACTCCTTTTATTGCG 3'	5' GACTTGGATGTCACAGGATG 3'	54
Exon4	5' ATTATGAATCCAAGGGGTGA 3'	5' GGAATGAAATGGGGTAGAGTAG 3'	50
Exon5	5' TTAGAGGTTGATGCCCATAGG 3'	5' GGAGTCTTATGAGGGGCAAA 3'	58

PCR reaksiyonu son hacim 50 µl olacak şekilde kurulmuş olup 5 µl 10X PCR tamponu (1,25 ml (NH₄)₂SO₄) (Fermentas, Litvanya); 1 µl 25mM MgCl₂ (Fermentas, Litvanya); son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı (Fermentas, Litvanya); 1 µl 10mM ileri (forward) primer (Metabion, Almanya); 1 µl 10 mM geri (reverse) primer (Metabion, Almanya); 5u/µl Taq polimeraz (Fermentas, Litvanya); 100 ng kalıp DNA (50ng/µl DNA'dan 2 µl) ve double distile su (ddH₂O)'dan oluşmaktadır. Ayrıca ekzon 4 ve ekzon 5 için ekstra bantları engellemek amacıyla standard PCR bileşenlerine ek olarak son hacmin %10'u kadar Betain (Sigma, ABD), DMSO (Sigma, ABD) kullanılmıştır. PCR reaksiyonu yukarıdaki çizelgede belirlenen sıcaklık derecelerinde ve belirlenen protokole Biorad (Biorad, ABD) cihazında gerçekleştirilmiştir.

5.2.3.2. CBS Geni Mutasyon Analizi

CBS geninin 18 ekzonu için her biri 0.1 µg/ml konsantrasyonunda iki primer seti kullanıldı.

Çizelge 5.2. CBS genine ait 18 ekzonun amplifikasyonu için kullanılan primer setleri

	Forward (İleri) Primer	Reverse (Geri) Primer	Erime Sıcaklığı
Ekzon1	5'GGGAACCCACAGCATCCGAG3'	5'TCAGCCCTCTTGATCAAAAGC3'	55
Ekzon2	5'TTTCCAGTTCTTCGAGTGTG3'	5'GGCCACTCATTAACCAGCGA3'	57
Ekzon3	5'TTTTCAGAACCCACAGACC3'	5'TCAAAGGAAGCTAGGTTGG3'	57
Ekzon 4-6	5'GGCCCCTCTCACCTCTG3'	5'GGTTCTGAAGGGTGAATAGG3'	59
Ekzon7	5'ACTTTTTGGTTACCCACCG3'	5'CCTTGCTTCCCAAACACC3'	57
Ekzon 8	5'CTGAACATTTAGGTCATTACC3'	5'TTTCACACGTTTTCCCTGC3'	58
Ekzon 9	5'TGICTGCAAAACGTGTTGG3'	5'AGCTTCAGCCTTGTCTAG3'	60
Ekzon 10	5'CATGCTCCCATGCGTGACGTGC3'	5'GCAGGATGGAGAGGAGCAGGG3'	55
Ekzon11-12	5'CAGTGAGGTCCAGGAGAG3'	5'AGACAGAACCCAGGACTG3'	52
Ekzon13	5'CGCTGACCCCTGCCTGCCC3'	5'GCCTGTAGGTGACTGCGCATC3'	56
Ekzon 14	5'ACTCCACAGAAAACCTCGTG3'	5'TAAAGACTGGGTGTCAGT3'	63
Ekzon15	5'CAAGTCTAACCCCATCTCC3'	5'AAGTAAATGTGAGATTAAGAGG3'	61
Ekzon 16	5'AAAAAAAAAAGGAACACAGCC3'	5'GAAAGCGAAGGAGAAGTGG3'	57

Diğer PCR komponentleri ise; 5 µl 10X PCR tamponu (1,25 ml(NH₄)₂SO₄) (Fermentas, Litvanya); 1 µl 25mM MgCl₂ (Fermentas, Litvanya); son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı (Fermentas, Litvanya); 5u/µl Taq polimeraz (Fermentas, Litvanya); 100 ng kalıp DNA (50ng/µl DNA'dan 2 µl) oluşmaktadır ve son hacim 50 µl olacak şekilde double distile su (ddH₂O) ile tamamlanarak PCR gerçekleştirilmektedir.

5.2.3.3. ERGIC-53 (*LMANI*) Geni Mutasyon Analizi

13 ekzondan oluşan ERGIC-53 geni için aşağıdaki çizelgede belirtilen her biri 0.1 µg/ml konsantrasyonunda olan primerler kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuştur.

Çizelge 5.3. ERGIC-53 genine ait 13 ekzonun amplifikasyonu için kullanılan primer setleri

	Forward (İleri) Primer	Reverse (Geri) Primer	Erime Sıcaklığı
Ekzon 1	5' TCGCGTTCCAGAATCCAA 3'	5' TCAGCACACCAGGGTAGC 3'	55
Ekzon2	5' CAGTTTGAAAATGTACATTGAG 3'	5'GGGAACAGTTAGAGGCTAG 3'	55
Ekzon 3	5' CATGCCTCTAACTGTTCCC-3'	5' CTCACAGCCTAACTCTGTTG-	49
Ekzon 4	5' TGTAAGTCACTCATAGTAC 3'	5' CAATGTATTCATAAGGATTCC 3'	57
Ekzon 5	5' TGAAAAGCTGA TGCTTGT 3'	5' GAAAAGTGATACTGTAACATTG 3'	57
Ekzon 6	5'GAAACAAAACCTGAATAGTAGTC 3'	5' ACAAGTCTACATATCCCTAA(AGC)3'	58
Ekzon 7	5' AGAGTGCCATTGCCTTTACC 3'	5' CAAACCTAAGTTAGTCTTCC 3'	60
Ekzon 8	5' CATGTATAGAGATATCTTAATG 3'	5' GTCCATGATCAACAGCCTC 3'	59
Ekzon 9	5' CACTTGGTCACTTACGTTA 3'	5' TCTATGAGCACATAGTACAG 3'	62
Ekzon 10	5' GGGAAAGTAAAGAAGAAGGGC 3'	5' AATCACATAACACACAAACG 3'	55
Ekzon 11	5' GTGATTTTATTGTATCAAGAG 3'	5' AGTATGAGTTCTTCCTTTCC 3'	58
Ekzon 12	5' GGGGATAGAAGGTTTCTGG 3'	5' GAACATAGATAACTTAGTTG 3'	58
Ekzon 13	5' CTGTTCAATTCAGTTCACAT 3'	5'AATTCCCTCAAACGACATC 3'	58

Diğer PCR komponentleri ise son hacim 50 µl olacak şekilde 5 µl 10X PCR tamponu (1,25 ml(NH₄)₂SO₄) (Fermentas, Litvanya); 1 µl 25mM MgCl₂ (Fermentas, Litvanya); son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı (Fermentas, Litvanya); 5u/µl Taq polimeraz (Fermentas, Litvanya); 100 ng kalıp DNA (50ng/µl DNA'dan 2 µl) ve double distile su (ddH₂O)'dan oluşmaktadır. PCR reaksiyonlarında DMSO ve Betain (Sigma, ABD)'den de kullanılarak reaksiyon güçlendirilmiştir.

5.2.3.4. MCFD2 Geni Mutasyon Analizi

ERGIC-53 geniyle ilişkili olan MCFD2 geni 14 ekzondan oluşmaktadır. Bu çalışmada mutasyon sıklığı en fazla görülen 5 ekzon çalışmaya dahil edilmiştir. Ve ilgili primer setlerinin her biri 0.1 µg/ml konsantrasyonunda olup aşağıdaki çizelgedeki gibidir:

Çizelge 5.4. MCFD2 genine ait 5 ekzonun amplifikasyonu için kullanılan primer setleri

	Forward (İleri) Primer	Reverse (Geri) Primer	Erime Sıcaklığı
Ekzon 1	5' TATGGATAGGAAGGGCCTCA 3'	5' TTCTGGGTCATACGCCTATCT 3'	55
Ekzon 3	5' GTCAGTCCCGCCAGTGCT 3'	5' CTTACGGTCTCCGAAGCAGA 3'	58
Ekzon 5	5' TAGATCCGCTGTGGGATAGG 3'	5' TTCTGCAAAGGGACTTCAGG 3'	57
Ekzon 8	5' CACAGTGCACGACCAAGAGT 3'	5' GGCCTAAAGATCTTCCACCTG 3'	55
Ekzon 9	5' CTGTCAATTGGCCTGAACCT 3'	5' GAGTTCAAGACCAGCCTTGG 3'	64

Bu primer setlerinden 2 µl kullanılarak son hacim 50 µl olacak şekilde 5 µl 10X PCR tamponu (Fermentas, Litvanya); 1 µl 25mM MgCl₂ (Fermentas, Litvanya); son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı (Fermentas, Litvanya); 5u/µl Taq polimeraz (Fermentas, Litvanya); 100 ng kalıp DNA (50ng/µl DNA'dan 2 µl) ve double distile su (ddH₂O) ile PCR reaksiyonu belirtilen sıcaklıklarda Biometra cihazında gerçekleştirilmiştir.

5.2.3.5. FGB Geni Mutasyon Analizi

FGB geninde yeralan 8 ekzon için aşağıda belirtilen primer çiftlerinden 0.1 µg/ml konsantrasyonunda kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonda 5 µl 10X PCR+ MgCl₂ tamponu (Bioron,Almanya), 2mM dNTP (Fermentas, Litvanya), 2 µl ileri ve geri primerler, 0.2 µl Taq polimeraz (Fermentas, Litvanya) ve 100 ng kalıp DNA (50ng/µl DNA'dan 2 µl) ve distile su kullanılmıştır. Reaksiyonlar her ekzon için genel olarak 94°C'de 5 dakika, bunu izleyen 35 siklusta; 95°C'de 1 dakika, tabloda

belirtilen erime sıcaklıklarında 1 dakika, 72°C’de 1 dakika, son siklusta 72°C’de 10 dakika olarak belirlenen protokolle PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. (Biorad,USA)

Çizelge 5.5. FGB genine ait 8 ekzonun amplifikasyonu için kullanılan primer setleri

	Forward (İleri) Primer	Reverse (Geri) Primer	Erime Sıcaklığı
Ekzon 1	5' GGTCAGCCAACAAGTGAACCAA 3'	5'CTACTAATAATATAATAATGC 3'	58
Ekzon 2	5'GTTACATTCCAAATCTTCTATAACAC3'	5'CATGAGAGAGCCACCACTGCA 3'	55
Ekzon 3	5' GTCCATGACCCAAATCCTTCAT3'	5'GTCTAACGGTTCCAATTTTATA 3'	55
Ekzon 4	5'GTTTTATGAGGCAAAAATGC 3'	5'GGTGTGTGAGTTCTTCTGG 3'	62
Ekzon 5	5' GGTGACTAAATACAAAGTAAT 3'	5'CAGATCAACAGGTCAACAAC 3'	63
Ekzon 6	5'GCTGTTGGTTAATATATGCTC 3'	5'TTAGCTTCCACATTTTGTG 3'	50
Ekzon 7	5' GACAAAAATGTGGAAGCTAA 3'	5'GCAGGAGCAAAGAGTGCCAC 3'	57
Ekzon 8	5'AACGTAACCTGACCACCGTA 3'	5' ATGTTGTCACATACAGAAGAG 3'	57

5.2.3.6. MYH9 Geni Mutasyon Analizi

MYH9 geni 44 ekzondan oluşmaktadır, bu çalışmada daha önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlara dayanarak, mutasyon sıklığı en çok olan 7 bölge çalışılmıştır. Bu bölgelere ait primerler çizelgede gösterilmiştir.

Çizelge 5.6. MYH9 genine ait 7 ekzonun amplifikasyonu için kullanılan primer setleri

	Forward (İleri) Primer	Reverse (Geri) Primer	Uzunluk	Erime Sıcaklığı
Ekzon 1	5' TGCCAGAAGCTGGTATGG 3'	5' TAACGCTCCTTGAGGTTGTG 3'	234	62.7
Ekzon 16	5'TGTTCTAGGCATGTTCTAGGCA 3'	5' TTCTACATGGATGGAGGACG 3'	295	64.6
Ekzon 25	5' GCAAATCTGCTCCTTGGAG 3'	5' AGCCAGGTCCTTCAACAGAC 3'	470	60.8

Ekzon 26	5' CTCTTTGGTCAGGGAAGAGC 3'	5' AACCAGGCAGTTGGGTAGAAC 3'	510	61.3
Ekzon 30	5' GGAAACTGCTGAGGAGGTGA 3'	5' AGAGGAAATGCAAGGATGG 3'	242	62.8
Ekzon 38	5' GTCCTGGTTAGGGCTTGTTG 3'	5' TGTGCAGTCCTTTCTTGGTG 3'	607	63.1
Ekzon 40	5' TGCTTCTTTCTGGTGGGAG 3'	5' ACAGCAGTCCCAAGAAGGTG 3'	353	63.1

10pmol/ l olan bu primerlerden 2 µl, 10X PCR tamponundan (Fermentas, Litvanya) 2,5 µl ; 25mM MgCl₂ (Fermentas, Litvanya)'den 2 µl ; 10 mM dNTP karışımı'ndan (Fermentas, Litvanya) 0,5 µl ; 5u/ µl Taq polimeraz (Fermentas, Litvanya), 100 ng kalıp DNA'dan 1-3 µl kullanarak PCR reaksiyonu double distile su (ddH₂O) ile son hacim 50 µl'e tamamlanarak yukarıda belirtilen sıcaklık şartlarında PCR cihazında (Techne; İngiltere) belirlenen protokollerde gerçekleştirildi.

4.2.3.7. GpIIB (*ITGA2B*) Geni Mutasyon Analizi

GpIIB (*ITGA2B*) geni 35 bölgeden oluşmaktadır. Bu geni PCR ile amplifiye ederken daha verimli sonuç alabilmek için baz çifti bakımından büyük olan bölgeler daha küçültülerek (promotor bölgesi, ekzon 4, ekzon12, ekzon13) küçük olan bölgeler ise birleştirilerek bu bölgelere göre primer tasarımı yapılmıştır (ekzon 9 ve 10, ekzon 14 ve 15, ekzon 16 ve 17, ekzon 23 ve 24).

PCR reaksiyonu aşağıdaki çizelgede belirtilen 10pmol/l olarak hazırlanan primerlerden 2 µl kullanılarak son hacim 50 µl olacak şekilde 5 µl 10X PCR tamponu (Fermentas, Litvanya); 1 µl 25mM MgCl₂ (Fermentas, Litvanya); son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı (Fermentas, Litvanya); 5u/µl Taq polimeraz (Fermentas, Litvanya); 100 ng kalıp DNA (50ng/µl DNA'dan 2 µl) ve double distile su (ddH₂O) belirtilen sıcaklıklarda Biorad cihazında (Biorad, USA) ilgili sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 5.7. GpIIB genine ait 35 bölgenin amplifikasyonu için kullanılan primer setleri

Bölge	Forward (İleri) Primer	Reverse (Geri) Primer	Erime Sıcaklığı
Promotor-a	5'AAGCTTGGCTCAAGACGGAG (GCC 3'	5'TACTACCACCGTGCTAGTCC 3'	55.3
Promotor-b	5'GGTAAAGATTCAAGAGACAT (GCC) 3'	5'TCAGATTCCTCCACAGGAAG 3'	55.3
Promotor-c	5'GAAGGGAAGGAGGAGGAGCT (GCC)5 3'	5' CTTCCCTTACGGCTCACCTC 3'	55.3
Ekzon 1	5' CTGGAATCTGCGCGGCGCTC 3'	5'(GCC)5GGGCAGTCCACGTCCCC 3'	57
Ekzon 2	5'CCCCACCCCTTCTTGTGCCT (GCC)5 3'	5' GCCCCGATTGTTCCCTGTG 3'	59
Ekzon 3	5' AGGAGGAGCCCAAGTCTCGC (GCC)5- 3'	5' ATCATTTTCCACGTAAATGC 3'	59
Ekzon 4-1	5' GAGTACTCCCCCTGTGCGGG 3'	5' AAAGCAAGGGCTGCGGCGCT 3'	58
Ekzon 4-2	5'GCGCGCGCCTCCCTTACCC 3'	5' GGGGGCCCTGTTTGGGAGCC 3'	58
Ekzon 5	5' GGGCGGCTCCCAAACAGGGC (GCC)5-3'	5' TGGGCGGTGACCCTCGGGGT 3'	57
Ekzon 6+7	5'CCCCTCTGTGCTTCCTCCCC 3'	5' TCCTCCCCGGGCTGGGCTAC 3'	61.5
Ekzon 8	5' (GCC)5-CATTCCCTGAGCTGGTCT 3'	5' AGCCACGCCCACTGGGACCT 3'	60
Ekzon 9+10	5' AAGAGGATGCTTGTCAGCG3'	5'CTGGTAATTTGGGACCCAAC3'	58
Ekzon 11	5' (GCC)5-CCAATATACCCCTGGTCCAG3'	5'AGAGCTGTGTGCCAGTCAGC3'	58
Ekzon 12-1	5'GCAGCCGCGAGGCCCCACG (GCC)53'	5'AGTGGCTGTTAACCCCTCTG3'	50
Ekzon 12-2	5'CCACACTTTCACCCCTTTC (GCC)5-3'	5'GTCCAAGGGCCTTCTTGGG3'	50
Ekzon13-1	5'AGGGAGGCTGAATAACAATC (GCC)53'	5'GTCCAAGGGCCTTCTTGGG3'	52
Ekzon 13-2	5'AACCTCCAGTGGGGGAGGTG (GCC)53'	5'CTGAGTCCCAGATCCTTTA3'	52
Ekzon 14+15	5'GGGACCTCAGAAAGGCTCCA (GCC)5-3'	5'GTGGGTAAGTTCTACTCTCCG3'	54
Ekzon 16+17	5'GCC)5-GTGGGATGTGTATGGTAGC3'	5' (TTGCTATCAGGGTCTGTCA3'	55
Ekzon 18	GCC)5-AAACCTCACACATCCCAAC3'	5'GTATGATAGGCAGAAAGGGC3'	55
Ekzon 19	5'CAGGCTCCCTGGCTTCACTC (GCC)53'	5'CTCCAGTGCCTCCAGGTCC3'	55
Ekzon 20	5'ATATATATATGATGCTCTGT3'	5'TTATTCATGAGCCCCTGGTG3'	60
Ekzon 21	5' (GCC)5-ATCAGAAGAAGGAGAATGAG3'	5'TTATTCATGAGCCCCTGGTG3'	59
Ekzon 22	5' (GCC)5-AAGACTGGAGGCCACATTCA3'	5'GCTCTGCACGGGGTTCAGAC3'	59
Ekzon23+24	5'GCC)5-ACTGGGCTGGTGTCCCTGGC3'	5'AGTTCTGAGGACCCGCTCAC3'	52

Ekzon 25	5'CCGGGTGAGGGCGCTAAGCTC (GCC)53'	5'TGGTTGGTCTGGGGCCGCCT3'	55
Ekzon 26	5'GGTTCGGGGGAGACCTGGGC (GCC)53'	5'-GCCCGAGACCAGAGAGCCTGC3'	50
Ekzon 27	5'GTAAGGGGGTGGGGGATGAT3'	5' CCCTCCCAGAGCAAAGTGGT3'	62
Ekzon 28	5' (GCC)5-CCAATAGGCCTCTGTGGGTG3'	5'GGACAATGGGTCTCTGCAGGA3'	63.5
Ekzon 29	5'(GCC)5-TCTTTGTGAAAGGCAGGTGT3'	5'AGGGCAGAGCCAAGCCTGTG3'	64
Ekzon 30	5'TCATCTGTATACCCTGACCT (GCC)53'	5' CACGCCCAACCCTCTCTGCTA3'	57

5.2.3.8. GpIIIA (*ITGB3*) Geni Mutasyon Analizi

GPIIB ile ilişkili bir gen olan GPIIIA geni 32 ekzondan oluşmaktadır. Daha önceki çalışmalarda elde edilen değişimlere dayanarak mutasyon sıklığı en çok olan 4 bölge belirlenmiş ve bu çalışmaya dahil edilmiştir. Aşağıdaki çizelgede belirtilen 10 pmol/l lik primer setleri ile PCR reaksiyonu kurulmuştur. PCR reaksiyonunda yer alan diğer komponentler; son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı (Fermentas, Litvanya), Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya), 10 mM Tris-HCl (oda sıcaklığında pH: 9,0), 50 mM KCl ve %0,1 Triton®, 25 mM MgCl₂'dir. Son hacim 50 µl'ye distile su ile tamamlanarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık şartları; 95°C'de 5 dakika, bunu izleyen 34 siklуста; 95°C'de 1 dakika, her primer setine göre belirlenen erime sıcaklıklarında 1 dakika, 72°C'de 1 dakika ve 72°C'de 10 dakika, olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir (Biometra, Almanya)

Çizelge 5.8. GpIIIA genine ait 4 ekzonun amplifikasyonu için kullanılan primer setleri

Bölge	Forward (İleri) Primer	Reverse (Geri) Primer	Erime Sıcaklığı
Ekzon 3	5' GTCGCCATAGTTCTGATTGC 3'	5' GCTTCAGGTCTCTCCCCGCA 3'	58
Ekzon 5	5'CCATGAAGGTGTCTGCTTAA3'	5'CTATGCCAGCCACACCTGGC 3'	60.5
Ekzon 10	5'CAAGGACAGCCTGATCGTCC 3'	5'GGTATATGAGGGGTGTGGGT 3'	54
Ekzon 11	5' TGGAGTGGAGCTCTCGCCAG 3'	5' GGATCCTCTCTACCTCCCA 3'	59

5.3. Agaroz Jel Elektrofrez

Agaroz (Sigma, ABD) kullanılacağı amaca uygun olarak belirli yüzdelerde hazırlanır. Bu çalışmada PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. %2'lik agaroz jel için 3 g agaroz tartılıp, TBE (Tris-Borik asit-EDTA) 1X solüsyonu ile 150 ml'ye tamamlanmıştır. TBE 1X solüsyonu; TBE 5X solüsyonunun 1/5 oranında ddH₂O ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. TBE 5X solüsyonu; 54 g Trizma® (Sigma, ABD), 27,5 g Borik asit (Carlo Erba, İtalya), 20 ml 0,5 M EDTA (Sigma, ABD)'nın 800 ml kadar deiyonize suda çözünmesi ve daha sonra deiyonize su (ddH₂O) ile 1 litre'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır. Agaroz istenilen yüzdelerde hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Beko, Türkiye) kaynatılmış, üzerine Etidyum Bromür'ün (Sigma, ABD) %5'lik stok solüsyonundan 2'şer µl ilave edildikten sonra iyice karıştırılmış, jel tabağına (Qwl Scientific, ABD) dökülmüştür. PCR ürünlerini yürütmek için 80 kuyucuklu dar tarak aralığına sahip jel sistemi (ABgene, İngiltere) kullanılmıştır. Agarozun polimerizasyonu için yaklaşık 30 dk beklendikten sonra jel, tabağıyla birlikte jel elektroforez tankına (Biometra, Almanya) yerleştirilmiş ve elektroforez tankı TBE 1X solüsyonu ile jelin üstünü kapatacak şekilde doldurulmuştur. PCR ürünlerinden 4 µl alınarak temiz bir parafilm (Parafilm, Chicago, ABD) üzerinde 0.5 µl 6X loading dye (yükleme boyası) (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), % 0.03 bromofenol mavisi, %0.03 ksilen siyanol FF, 60% gliserol, 60 mM EDTA) (Fermentas, Litvanya) ile karıştırılmış ve jel kuyucuklarına yüklenmiştir. PCR ürünlerinin değerlendirilebilmesi ve reaksiyonun istenilen uzunluktaki bölgeyi doğru çoğalttığını görebilmek amacıyla 2 µl marker (ΦX174 DNA-HaeIII BioLabs, ABD) PCR ürünleriyle birlikte jele yüklenmiştir. 90-100 V akımda 15 dk kadar yürütülmüştür (Wealtec, Tayvan). Daha sonra ultraviyole ışıkta (Spectroline, ABD) incelenmiş ve Image Analyser'da (Alpha Imager, ABD) fotoğraflanmıştır.

5.4. Tek Zincirli Yapısal Polimorfizmi (SSCP) için Poliakrilamid Jel Hazırlanması

SSCP jelinin döküleceği camlar distile su ile yıkanıp alkol ile silindikten sonra camlar arasına 1,5 mm kalınlığında spacerlar yerleştirilip, camlar sabitlenmiştir.

Bu çalışmada %7'lik poliakrilamid jel kullanılmıştır. Bu jel için %40'luk, 49:1 oranındaki akrilamid/bisakrilamid solüsyonu kullanılmıştır. Bunun için 380 g Akrilamid (Merck, Almanya) ve 20g N-N'-metilen-bis-akrilamid (Sigma, Almanya) bir miktar distile su ile 37°C'de ısıtılarak çözülür ve hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlanır (Sambrook, 1989).

Jel yapımı için kullanılan TBE 5X solüsyonu, 54g Tris (Ambresco, ABD) 27,5g Borik asit (AppliChem, Almanya), 20mL 0,5 M pH:8 EDTA (AppliChem, Almanya) distile su ile 1000 mL hacime tamamlanarak yapılmıştır.

Jelin polimerleşmesi için kullanılan %10'luk Amonyum Persülfat; 1 g Amonyum Persülfat (AppliChem, Almanya) distile su ile 10 mL'lik hacime tamamlanarak hazırlanmıştır.

Jel 12,34 mL % 40'luk akrilamid/bisakrilamid solüsyonu, 14 mL TBE 5X solüsyonu, 40,16 mL distile su ve 3,5 mL gliserol (Merck, Almanya) kullanılarak hazırlanmıştır. Karışım 0,22 µm filtreden süzöldükten sonra vakum ile havası alınmıştır. Ardından bu jel içeriğine 0,6 mL %10'luk Amonyum Persülfat ve 40 mL TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamid) (Sigma, Almanya) eklenerek hazırlanan camlar arasına dökülmüştür. Jel polimerleşmeden önce 1,5 mm'lik tarak camlar arasına yerleştirilerek örneklerin yükleneyeceği kuyuların oluşması sağlanmıştır.

Jel polimerleştikten sonra taraklar çıkartılmış ve camlar vertikal jel elektroforez sistemine (Biorad, ABD) yerleştirilmiştir.

PCR ürünlerine spesifikliği arttırmak amacıyla belli bir oranda denatüre edici yükleme boyası ve oligonükleotid eklenmiştir. Kullanılan yükleme boyası toplam hacminde %95 formamid, 20 mM EDTA, %0,05 Xyelene Cyanol (AppliChem,Almanya), %0,05 Brom-fenol mavisi (Merck, Almanya) içermektedir. 2 µL PCR ürününe 7 µL yükleme boyası, 1'er µL 3 pmol düz ve ters oligonükleotid eklenerek bir karışım hazırlanmıştır ve 99°C'de 8 dk denatüre edilerek jele yüklenmiştir.

Sistemde tampon olarak TBE 1X solüsyonu kullanılmıştır. Örnekler 130 volt akımda altında, belirlenen sıcaklıkta baz çifti uzunluklarına göre 12-20 saat yürütülmüştür. Elektroforez sonrası jel gümüş boyama ile boyanarak bantlar görünür hale getirilmiştir.

5.4.1. SSCP Jeli İçin Gümüş Boyama

Gümüş boyama için üç farklı solüsyon kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi %1 lik gümüş nitrat çözeltisidir. 5 g gümüş nitrat (AgNO₃) (AppliChem, Almanya) tartılıp distile su ile 500 ml'ye tamamlanır. İkinci çözelti %15 lik sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisidir. 150 g katı sodyum hidroksit'in distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanır. Son solüsyon ise %7,5'lik Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya) solüsyonudur ve bu solüsyon %7,5'lik sodyum bikarbonat (Na₂CO₃) distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanır.

Elektroforez sonrası jel, stok solüsyonundan distile su ile 9:1 oranında seyreltilerek hazırlanan % 0,1'lik gümüş nitrat solüsyonu ile 5dk muamele edilir. Daha sonra % 1,5'lik sodyum hidroksit solüsyonuna formaldehit eklenip gümüş solüsyonla boyama aşamasını takiben jelle muamele edilir. Jel % 0,75'lik sodyum bikarbonat solüsyonu içinde birkaç dakika bırakılarak boyama işlemi sonlandırılır. Böylelikle jeller görünür hale getirilerek bant farklılığı olan örnekler belirlenir.

Bu yöntemle taranan PCI, FBG, CBS, ERGIC-53 ve MCFD2 genlerinde bant farklılığı saptanan bireyler DNA Dizi Analizi yöntemi ile taranmıştır.

5.5. PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu (Temizlenmesi)

PCR ürünlerinin pürifikasyonunda üç ayrı yöntem kullanılmıştır.

PCI ve CBS genlerine ait PCR ürünleri, PCR pürifikasyon kiti (Agencourt® AMPure®, ABD) kullanılarak temizlendi. Bu yöntemde 50 µl PCR ürünü, 90 µl manyetik boncuklar içeren solüsyonla homojenize olana kadar pipetle plakada karıştırılır. Bu adımda 100 bç'den uzun olan PCR ürünleri manyetik boncuklara bağlanır. 3 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra magnetin üzerine yerleştirilerek 10 dk bekletilir. DNA'yı bağlayan boncuklar kuyucukların etrafında halka oluşturarak bulanık olmayan temiz bir görüntü oluşur. Manyetik boncuklara dokunmadan süpernatant ortamdaki uzaklaştırılır. Plaka magnetin dışına alındıktan sonra 200 µl %70'lik etanol ilave edilir ve tekrar magnetin üzerine yerleştirilerek 30sn bekletilir. Boncuklar yapışınca etanol ortamdaki uzaklaştırılır ve bu işlem bir kere daha tekrarlanır. Süpernatant pipetle uzaklaştırılarak örnekler 20 dk kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra 40 µl ddH₂O ile sulandırılarak homojenize bir görüntü oluşana kadar pipetle karıştırılır. Pürifiye edilen

PCR ürünleri hazırlanan %2'lik agaroz jele 5'er µl yüklenerek, dizi analizi için reaksiyona ne kadar konulacağı belirlenir.

İkinci yöntem olan 'Polietilen Glikolle Pürifikasyon' da ise 50 µl PCR ürününe 1/1 oranında PEG eklenir, 37°C de 15 dk bekletilir. 14000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. Daha sonra supernatant kısmı alınır ve %80 etanolla 2 kez yıkanır, 30 dk kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra 25 µl ddH₂O ile sulandırılarak homojenize bir görüntü oluşana kadar pipetle karıştırılır. Pürifiye edilen PCR ürünleri hazırlanan %2'lik agaroz jele 5'er µl yüklenerek, dizi analizi için reaksiyona ne kadar konulacağı belirlenir. PEG yöntemiyle FBG, ERGIC-53, MCFD2 genlerinin pürifikasyonu yapılmıştır.

GpIIB ve GpIIIA genlerinde ise pürifikasyon, kolonlu pürifikasyon kit olarak bilinen 'Roche PCR Production Purification Kit' kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde 50 µl PCR ürününe 250 µl Binding Buffer eklenir ve vortekslenir. Bu karışım kit içerisinde yer alan yüksek saflık sağlayan filtre tüplere alınır ve 13000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir. Süpernatant atılır, filtre tüplerine ilk seferde 250 µl yıkama tamponu, ikinci seferde 100 µl yıkama tamponu eklenir ve santrifüjlenerek örneklerin yıkanması sağlanır. Daha sonra filtre tüpleri yeni ependorflara takılır ve tüplere 25 µl elution tamponu eklenir, 13000 rpm'de 1 dk santrifüjlenir. Toplanan örnekler, hazırlanan %2'lik agaroz jele 5'er µl yüklenerek, dizi analizi için reaksiyona ne kadar konulacağı belirlenir.

Bağlanma tamponu; 3M guanidine-thiocyanate, 10Mm Tris-HCl, %5 etanol, pH 6.6 (25°C)'dan, yıkama tamponu; 20Mm NaCl₂, 2Mm Tris-HCl, pH 7.5 (25°C)'dan, Elution tampon ise 10Mm Tris-HCl, pH 8.5 (25°C) içeriklerindedir.

5.6. DNA Dizi Analizi

Bu çalışmada istenen DNA parçacığının nükleotit dizisinin belirlenmesi için Sanger'in enzimatik yöntemi esasına dayalı, tam otomatik kapiller sistemli çalışan bir DNA dizi analizi cihazı kullanılmıştır (CEQ8800, Beckman Coulter, ABD). Cihaz için 0,2 mL'lik, 96 tane kuyucuk içeren plaklar kullanılmıştır. Her bir örnek için 8 µL sekans solüsyonu (premix; 2 µL 10X reaksiyon tamponu, 1µL dNTP karışımı, 2µL ddUTP, 2µL ddGTP, 2µL ddCTP, 2µL ddATP, 1µL polimeraz enzimi), 1µL temizlenmiş PCR ürünü, 2 pmol

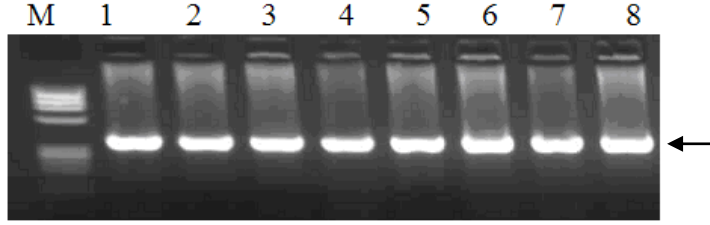
ileri veya geri oligonükleotid ve hacmi 20 µL'ye tamamlayacak kadar distile su konularak "cycle sequencing" gerçekleştirilmiştir. Bu program 94°C'de 5 dk ilk denatürasyon, 30 siklus 96°C'de 20 s denatürasyon, 50°C'de 20 s yapışma ve 60°C'de 4 dk'lık uzama evresi şeklinde gerçekleşmektedir. "Cycle sequencing" sonlandıktan hemen sonra örneklerin içine reaksiyonun durdurulması için her bir örnek için 5 µL durdurma solüsyonu (1,5 M C₂H₃O₂Na, 50 mM EDTA, 20 mg/mL'lik Glikojen) ve 60 µL %95'lik soğuk etanol eklenerek +4°C'de 4000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir (Hettich, Almanya). Üstteki kısım dökülerek %70'lik alkolden 200 µL eklenmiş, +4°C'de 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek üstteki kısım dökülmüştür. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra örnekler liyofilizatör cihazına (Christ, Almanya) yerleştirilmiş ve yüksek vakum altında 45 dk kurutulmuştur. Kuruyan örneklerin üzerine 25 µl formamid içeren solüsyon eklenerek DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrı tutulması sağlanmıştır. Her bir kuyucuk mineral yağ ile kapatıldıktan sonra plak DNA dizi analizi cihazına yerleştirilmiş ve cihazın bağlı bulunduğu bilgisayardaki CEQ Sequencing Software programı aracılığı ile sonuçlar görünür hale getirilmiştir.

6. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada Protein C İnhibitor geni (PCI), Systationin beta sentaz geni (CBS), Endoplazmik Retikulum Golgi Intermediate Compartment -53 (ERGIC-53) geni ve Multipl Koagülasyon Faktör Eksikliği 2 (MCFD2) geni, Miyozin Ağır Zincir-9 (MYH9) geni, Fibrinojen beta zincir (FGB) geni, Glikoprotein IIB geni (GpIIB) ve Glikoprotein IIIA (GpIIIA) genleri klinik olarak nadir görülen hematolojik hastalıklar kapsamında yeralan sırasıyla pediatrik inme, homosistinüri, FV- FVIII kombine eksikliği, afibrinojenemi, makrotrombositopeni, Glanzmann trombastenisi tanısı almış hastalarda taranmıştır. Çalışmada Türk populasyonunda nadir görülen hastalıklarda sık görülen mutasyonların ortaya konması ve daha sonraki çalışmalarda mutasyon analizi yapılırken bu değişiklikler öncelikli olarak taranarak hem zaman hem de maliyet açısından fayda sağlanması amaçlanmıştır.

6.1. Protein C İnhibitör (PCI) Geni Mutasyon Analizi

90 pediatrik inme hastası ve 110 sağlıklı kontrolde *PCI* geninin 35 ekzonu polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle çoğaltılmıştır. Çoğaltılan örnekler %2'lik agaroz jelde 90V'da 5 dk yürütülmüştür. PCR sonunda elde edilen ürün boyutu 2.ekzon için 265 bç. uzunluğundadır.



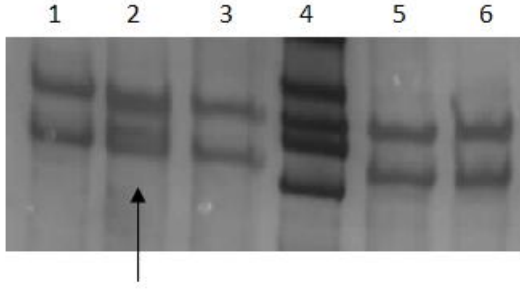
Şekil 6.1. *PCI* geni ekzon 2 PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

M: ϕ X174 DNA-HaeIII Marker, 1-8 : pediatrik inme hastalarına ait örnekler

Bu çalışmaya pediatrik inme hastası olup aynı zamanda kemik iliği transplantasyonu geçiren bir aile de dahil edilmiştir. Kemik iliği transplantasyonu temel olarak kemik iliği kaynağının “hastanın kendisi” veya “bir başkası” olmasına göre sırasıyla “otolog” veya “allojenik” olarak sınıflandırılmaktadır. Allojenik transplantasyonda en tercih edilen donör riski en az olduğu için “doku tipi tam uygun kardeş”tir. Bunun dışında “alternatif donörler” yani doku tipi kısmi uygun veya haploidantik aile bireyleri veya aile dışı donörler kullanılarak da transplantasyon işlemi yapılmaktadır. Armitage ve ark. yaptıkları çalışmada kemik iliği transplantasyonundan sonra hastalarda ATIII, Protein C ve Protein S seviyelerinde düşme olduğu gösterilmiştir (143).

Bu çalışmaya katılan hastalardan birinde FV Leiden mutasyonu taşıyan bir babadan pediatrik inme tanısı almış bir çocuğa kemik iliği transplantasyonu yapılmıştır ve bu hastalarda *PCI* gen değişimi olup olmadığına bakılmış, sonucunda koagülasyon kaskadında yer alan proteinlerde meydana gelebilecek defektlerin transplantasyonla donörden alıcıya geçip geçmediğinin tespitinin yapılması amaçlanmıştır.

PCR ile amplifiye olan örneklerde farklı bant profili olup olmadığını tespit edebilmek amacıyla örnekler tek iplikçikli yapısal polimorfizmi (SSCP) tekniği ile %7'lik poliakrilamid jelde yürütülmüştür.



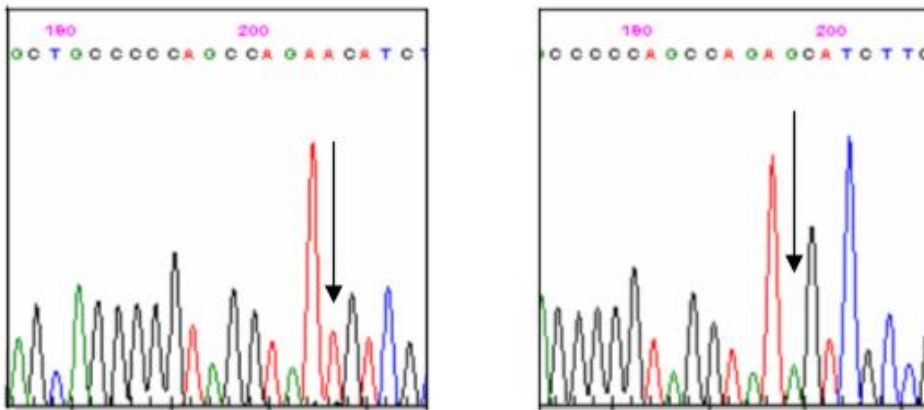
Şekil 6.2. Farklı bant profili veren hastanın belirlenmesi

1, 3, 5, 6 : Hastalara ait aynı profil gösteren örnekler

2: Hastaya ait farklı bant profili örneği

4: ϕ X174 DNA-HaeIII Marker

SSCP tekniği ile farklı bant profili veren hastalar tespit edilmiş ve DNA Dizi Analizi yöntemiyle dizilenmiştir. FVL 1691 G>A pozitif, pediatrik inmeli bir hastada PCI geninin 2. ekzonunda 6760. nükleotide, proteinde 188. pozisyonda Serin aminoasidini kodlayan AGC kodonunun AAC kodonuna dönüşümüne neden olan Guanin>Adenin değişimi saptanmıştır. Bu değişim insan genlerinde tanımlanmış tüm mutasyonları içeren bir veritabanı olan 'Human Genome Mutation Database'de / İnsan Genom Mutasyon Veritabanı- HGMD değerlendirildiğinde literatürde daha önce görülmediği tespit edilmiştir ve ilk kez bu çalışma ile tanımlanmıştır.



Şekil 6.3. PCI geninde hasta ve kontrolde DNA Dizi Analizi Karşılaştırması

“Ensembl” veritabanı kullanılarak Ser188Asp değişiminin transkript üzerindeki yeri ve meydana gelen aminoasit değişiminin yeri gösterilmiştir.

```

481 AGAGCATCTTCTTCTCCCCTGTGAGCATCTCCATGAGCCTGGCCATGCTCTCCCTGGGGG
188 AGAGCATCTTCTTCTCCCCTGTGAGCATCTCCATGAGCCTGGCCATGCTCTCCCTGGGGG
63 Q--S--I--F--F--S--P--V--S--I--S--M--S--L--A--M--L--S--L--G--

```

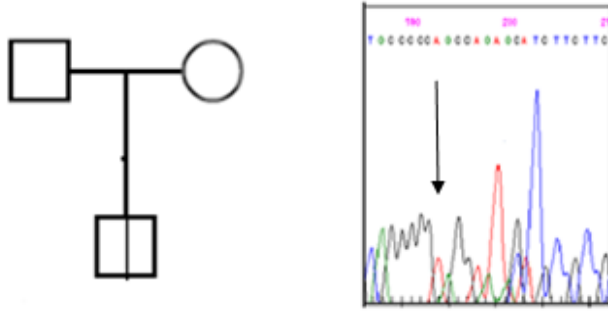
Şekil 6.4. PCI geni cDNA’ında meydana gelen değişimin kodon düzeni ve aminoasit değişimi

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000188488;r=14:95027779-95059457;t=ENST00000553780)

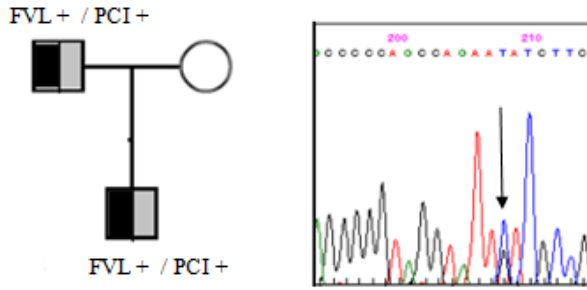
Değişimin protein üzerindeki etkisini saptamak amacıyla internet tabanlı bir program olan Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>) kullanılmıştır. Bu program dizinin evrim boyunca korunmuşluğunu proteinin tahmini yapısını göz önüne alarak hesaplamaktadır. Yapılan hesaplama sonucunda dizide var olan aminosit ile değişim sonucu oluşan aminosit için bir skor elde edilmektedir. Bu skor değeri 2’den büyükse değişimin proteini hasara uğrattığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda karşılaştırmak amacıyla NCBI e-veritabanında yer alan “Multipl Alignment Tool” seçeneği kullanılarak türler arasında karşılaştırma yapılmış aminoasidin bulunduğu konumun genin fonksiyonu açısından önemli olduğu bu nedenle de meydana gelen mutasyonun genin fonksiyonu üzerinde etkiye sahip olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Bu sonuç evrimsel süreçte aminoasidin türler arasında neden korunduğunu açıklamaktadır.

Çizelge 6.1 PCI geninin Homo sapiens’te 188. pozisyonunda yer alan Serin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi

Homo sapiens	...YRALASAAPSQ	S	IFFSPVSISMSLA...
Mus musculus	... YRALASAAPSQ	S	IFFSPVSISMSLA...
Gallus gallus	... YRALASAAPSQ	S	IFFSPVSISMS-A...
Canis lupus familiaris	... YRALA+AAPSQ	S	IFFSPVSISMSL-...
Nomascus leucogenys	... YRALASAAPSQ	S	IFFSPVSISMSLA..
Loxodonta africana	... YRALASAAPSQ	S	IFFSP+SISMSLA...
Callithrix jacchus	... YRALVSADPSQ	S	IFFSP-SIS-SLAM...
Bos taurus	... YRALA+AAP+Q	S	IFFSPSVS-SMSLA
Pan troglodytes	... YRALASAAPSQ	S	IFFSPVSIISMSLA...
Rattus norvegicus	... YRALASAAPSQ	S	++FSP+S-SMALA..



C.



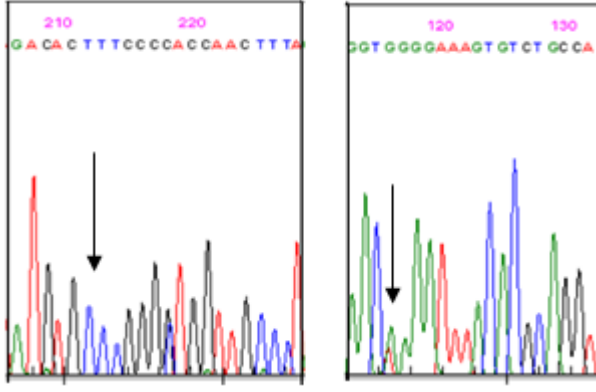
Şekil 6.5. PCI geni transplantasyon öncesi/ sonrası DNA Dizi Analizi

A: Transplantasyon sonrası soyağacı ve DNA Dizi Analizi

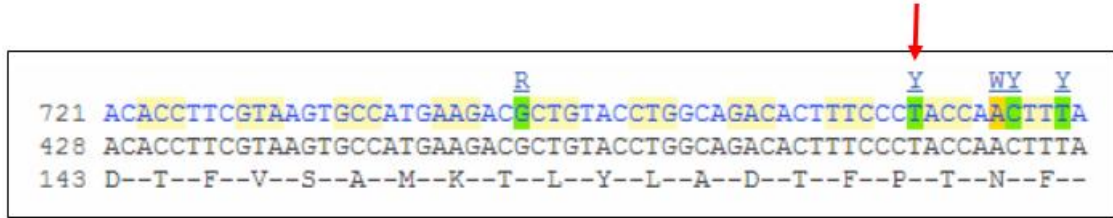
B: Transplantasyon öncesi soyağacı ve DNA Dizi Analizi

C: Donör(baba) – Çocuk FVL+/ PCI + ‘i gösteren soyağacı ve Donörün DNA Dizi Analizi

Bu değişimlerin yanı sıra pediatrik inmeli hasta grubunda 2 hastada Ekzon 2 de 26998. nükleotide meydana gelen heterozigot Timin-Sitozin değişimi ise proteinin kodlanmasında herhangi bir değişime neden olmamakta ve prolin aminoasidi kodlamaktadır.



Şekil 6.6. PCI geni ekzon 2 Forward ve Reverse primerlerle yapılan DNA Dizi Analizi görüntüleri



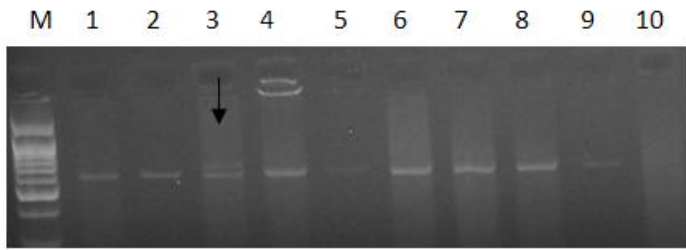
Şekil 6.7. PCI geninin cDNA'sında meydana gelen değişimin kodon düzeni ve aminoasit değişimi(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000188488;r=14:95027779-95059457;t=ENST00000553780)

PCI geninde 159.kodonda meydana gelen T>C değişiminin aminoasitte değişime neden olup olmadığı ‘Ensembl’ veritabanı kullanarak gösterilmiştir.

6.2. CBS Geni Mutasyon Analizi

Homosistinüri tanısı almış 10 hasta ve 90 sağlıklı kontrolde CBS genine ait 18 ekzon polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)yöntemiyle ile amplifiye edilmiştir. Amplifiye olan örnekler %2' lik agaroz jelde 90 V'da baz uzunluklarına bağlı olarak değişen sürelerde yürütülmüştür. Değişim bulunan bölgeler için PCR ürün boyutları sırasıyla ekzon 4ve 6'ı kapsayan bölge için 626 bp, ekzon 8 için 598 bp, ekzon 11-12 için 617 bp'dir.

4. ve 6 .ekzonu kapsayan 626 bp'lik bölge PCR yöntemiyle amplifiye edildikten sonra örnekler SSCP analizi yapıldığında bu bölgede hem agaroz jel görüntüsünde hem de SSCP jelinde (poliakrilamid jelde) 1 hastada farklı bant profili gözlenmiştir.

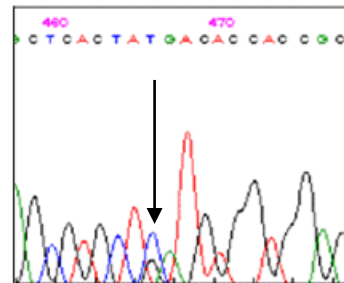


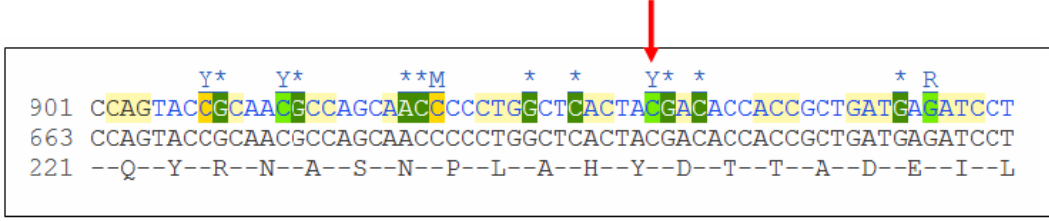
Şekil 6.8. CBS geni ekzon 4-6 PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

M: ϕ X174 DNA-HaeIII Marker, 1-10: Homosistinüri hastalarına ait örnekler

3 no'lu örnekte görülen değişimi saptayabilmek amacıyla 4. ve 6. ekzonu içerisine alan bölgelere uygun primerler ile DNA Dizi Analizi yapılmıştır. Analiz sonucu , 6955. nükleotide Sitozinden Timine heterozigot bir değişim meydana gelmiştir. Bu değişim proteinde herhangi bir aminoasit değişikliğine neden olmayıp sessiz mutasyona yol açmaktadır.

```
AGCTCACGGGCTCTGCTCTCTTTCTATGCAGTACCGCAAC  
GCCAGCAACCCCTGGCTCACTACGACACCACCGCTGATG  
AGATCCTGCAGCAGTGTGATGGTGCCTCCCTCTGTCCATC  
TTGATTGCATTTATCCCTGGCTGCCTGGGAGTGTACACAT  
CTCTTGCCCTCTCCTTGGTG
```

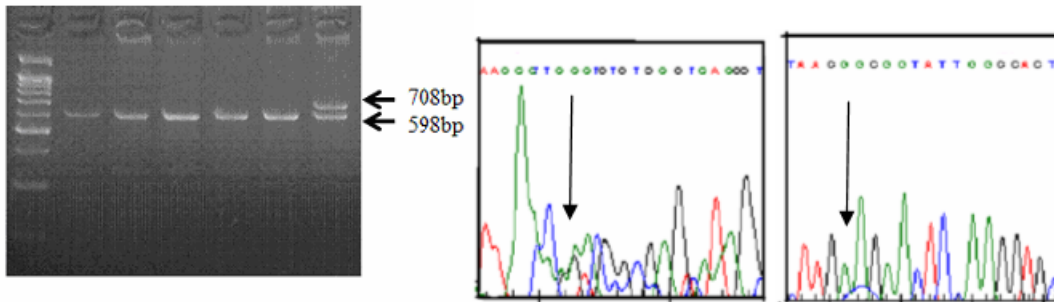




Şekil 6.9. CBS geni ekzon 4-6 bölgesinde sessiz mutasyona neden olan C>T değişiminin meydana geldiği nokta, DNA Dizi Analizi görüntüsü ve bunun proteine olan etkisi

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000160200;r=21:44473301-44497053;t=ENST00000352178)

CBS geni 8. ekzonunun taraması sonucu PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi ile bir hastada bant farklılığı tespit edilmiş ve bu hastanın DNA'sı, DNA Dizi Analizine tabi tutulduğunda İnsan Gen Mutasyon Veritabanında (HGMD) daha önce tanımlanmamış gen değişimi tespit edilmiştir: 110 bç'lik insersiyon. Bu insersiyon 855.nükleotide başlamakta ve 965. Nükleotide sonlanmaktadır ve aminoasitte değişime neden olmaktadır. Serin aminoasidini kodlayan TCA kodonu insersiyonun varlığı nedeniyle TGG kodonuna değişmekte bu durum da triptofan aminoasidinin kodlanmasına neden olmaktadır.

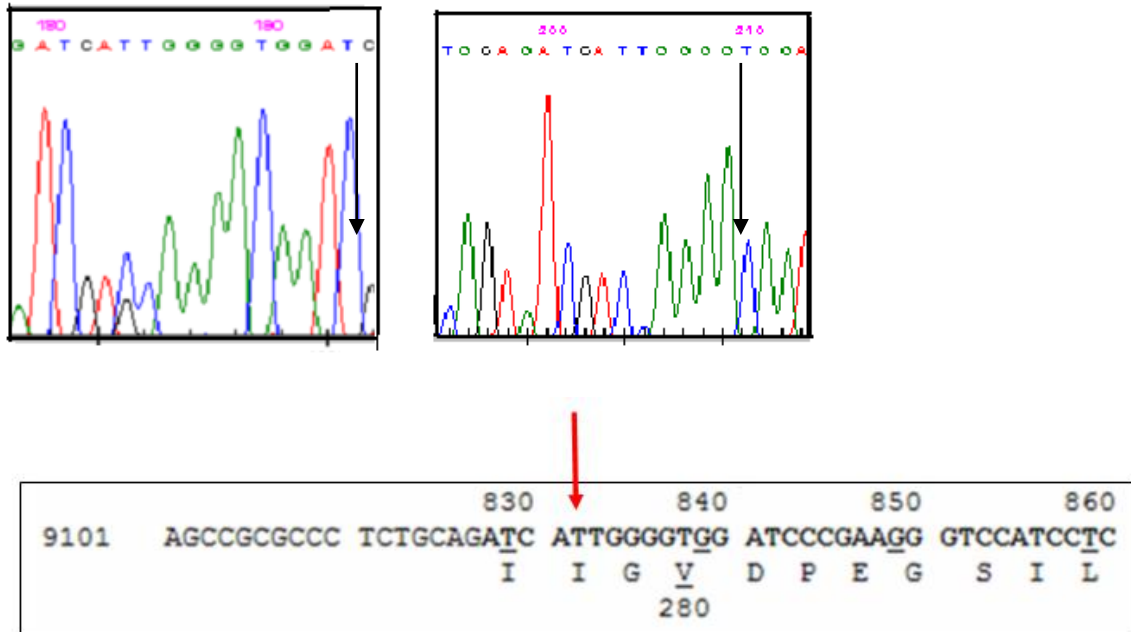


Şekil 6.10. CBS geni ekzon 8' de 110bç' lik insersiyon agaroz jel görüntüsü ve hasta-kontrol DNA Dizi Analizi görüntüleri

CTGAACATITAGGTCATTACC GCTTTAATACTTG GAGCCTGG GTTCTTGGG TTTCTCATCCTGCTCTGAGGCTGG GAACAGGCCACCACCCACAG GCAGATC
 ATTAACAGGCAGTTGTTAACGGCGGTATTG GCCACTCCCAT AATAGAATATC GAGGCATGTCCAGGCGGG GCTTTTGTGGCCTTGAGCCCTGAAGCCGCGC
 CCTCTGCAGATCATTGGGGTGGATCCCG AAGGGTCCATCCTCGCAGAGCCGGAG GAGCTGAACCAGACGGAGCAG ACAACCTACGAGGTGGAAGGGATCG
 GCTACGACTTCATCCCCACGGTGTGGACAGGACGGTAGGTCGAGTCCAGAGCCCGCCACAGTGCCGGTGCAGCCTGTA AACTCACCTCACACTGGGGAG
 CCTGGCTGACCTGGGCCCCAACCAGCTTCTCCACTGAAACAGAAGGGCAAGCCCCGCACGCATGGTGAGAAGCTGGTCTCGAAGGTCGAGACAAAGTAGA
 CTGGGGGACGATGTCCGCACAGTGGCCTGACCTACCAAGGGATGTAGCCAGGTG GCACAGGCAGGGAGCAGGGAAAAACGTGTGAAA

Şekil 6.11. CBS geni ekzon 8 de 110 bç'lik insesiyonun başladığı nokta ekzon üzerinde gösterilmiştir.

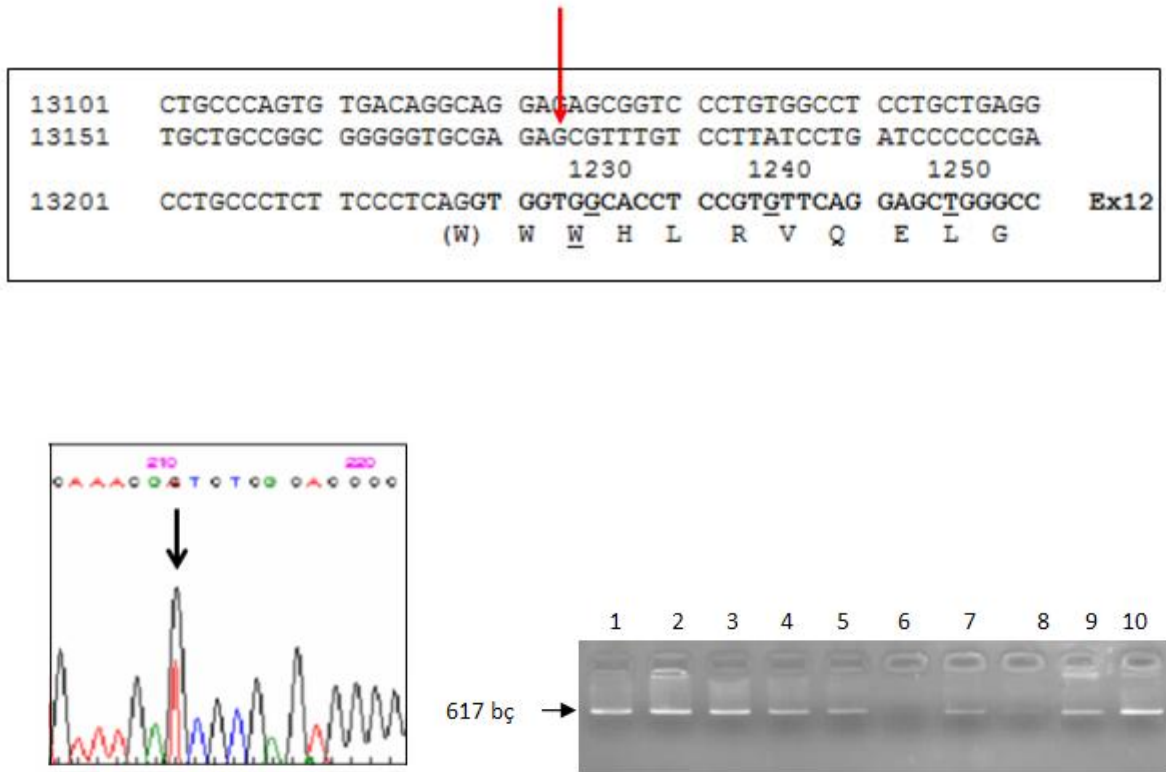
İnsersiyon tespit edilen homosistinürili bu hastada aynı zamanda ekzon 8'de daha önce tanımlanan heterozigot 833 Timin-Sitozin değişimi bulunmuştur. 9122. nükleotitte meydana gelen bu değişimin izolösinden treonin aminoasidinin kodlanmasına neden olarak yanlış anlamlı mutasyona (missense mutasyon) sebep olduğu bulunmuştur.



Şekil 6.12. CBS geni ekzon 8 de 9122T>C değişiminin hasta- kontrolde DNA Dizi Analizi görüntüleri ve bu değişimin proteine olan etkisinin gösterilmesi (Bu etki CBS mutation database- <http://cbs.lf1.cuni.cz/mutations.php> kullanılarak gösterilmiştir.)

CBS geninde bir diğer değişim ise 11 ve 12. ekzonları kapsayan 617 bç'lik bölgede bulunmuştur. Bu bölgeyi kapsayan primerlerle yapılan PCR reaksiyonu ürünleri SSCP

yapılmış ve farklı bant profili veren örnek DNA Dizi Analizine tabi tutulmuştur. Analiz sonucu intronik bölgede daha önce HGMD’de tanımlanmamış intronik bir değişim saptanmıştır: 13175. nükleotitte Guaninden Adenine heterozigot değişim. Bu intronik değişim insan genlerinde tanımlanmış tüm mutasyonları içeren bir veritabanı olan ‘Human Genome Mutation Database’de /İnsan Genom Mutasyon Veritabanı-HGMD değerlendirildiğinde literatürde daha önce görülmediği tespit edilmiştir ve ilk kez bu çalışma ile tanımlanmıştır.



Şekil 6.13. CBS geninde intron 11de meydana gelen 13175 G>A değişimin dizi üzerinde gösterimi ve DNA Dizi Analizi görüntüsü

İntronların büyük kısmı 5’-3’ yönünde GT dizisi ile başlamakta ve AG dizisi ile bitmektedir. Bu diziler sırasıyla splice donor (Ayıklama verici) ve splice acceptor (ayıklama alıcı) bölgeler olarak tanımlanmaktadır. Genlerin çoğunda bu diziler mevcut olup splice-ayırıcı bölge görevini görürler. Bu nedenle GT ya da AG dizisinde meydana gelecek bir değişim splice-ayıklama mekanizmasını etkileyerek transkriptin farklı splice olmasını sağlayacak ve proteinin yapı ve fonksiyonunu etkileyecektir. (<http://www.web->

books.com/MoBio/Free/Ch5A4.htm) Bu hastada bulunan değişim 11. intron ile 12. ekzonun başlangıç noktası arasında ortada bir noktada olmasından dolayı splice-ayırıcı mekanizmadan etkilenmemekte ve proteinde herhangi bir değişime neden olmamaktadır.

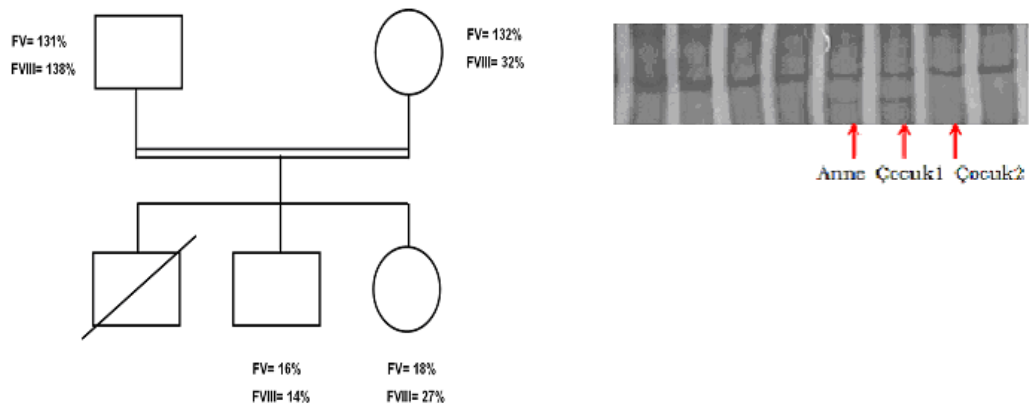
Çalışma grubunu oluşturan 10 homosisteinürlü hastadan 7'sinde herhangi bir değişim bulunamamıştır. Kontrol grubunda ise tek iplikçikli yapısal polimorfizmi (SSCP) sonucu farklı bir bant profiline rastlanamamıştır.

6.3. ERGIC-53 Geni Mutasyon Analizi

FV-FVIII Kombine eksikliği görülen hastalarla yapılan çalışmaya 11 hasta, 85 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Bu hastalarda ERGIC-53 genine ait 13 ekzonda gen taraması yapılmıştır.

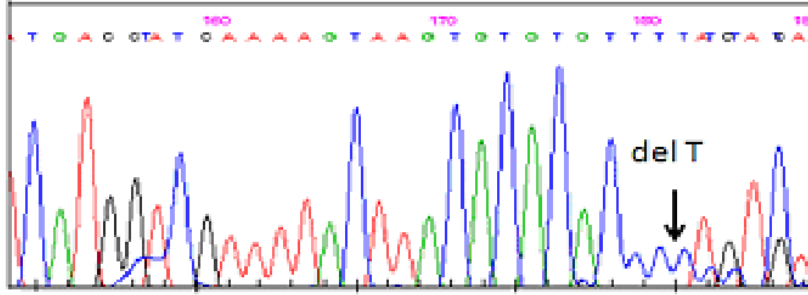
OLGU 1

Ailede gen taraması sonucu ERGIC-53 geninde ekzon 4' de SSCP taramasında anne ve iki çocuğunda farklı bant profili tespit edilmiştir. Aileye ait soyağacı ve SSCP analizi sonucu şekil 4.15 de gösterilmiştir.



Şekil 6.14. FV- FVIII değerlerini gösteren aile soyağacı ve aileye ait SSCP analiz görüntüsü

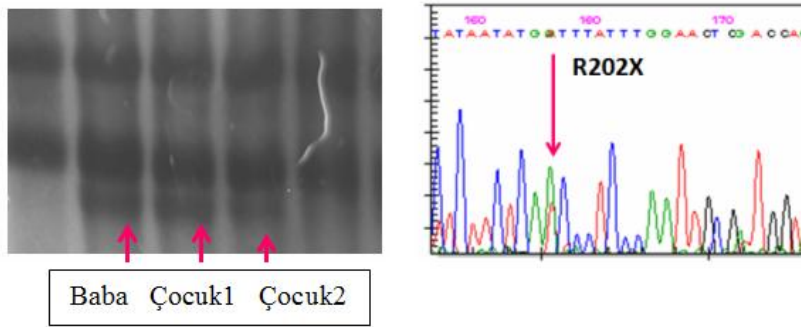
Anne ve iki çocuğuna ait DNA lar DNA dizi analizi yapıldığında annede 4. ekzonda Timin delesyonu tespit edilmiştir.



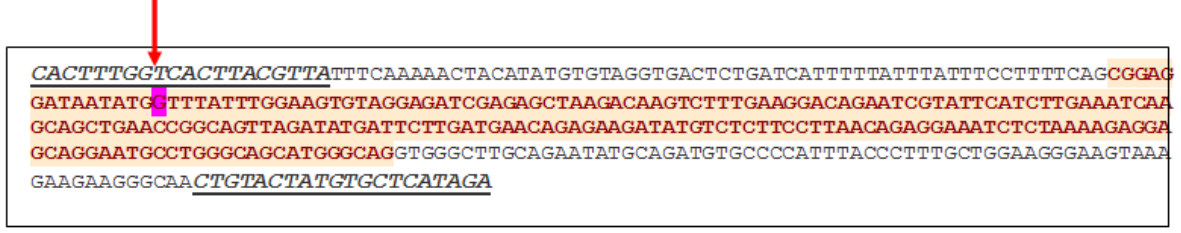
Şekil 6.15. Anneye ait DNA da ERGIC-53 geni ekzon 4 ün DNA Dizi Analizi görüntüsü

Gen üzerinde 4. ekzonda 1233. nükleotitte meydana gelen bu değişimin protein üzerine olan etkisine bakıldığında 157.pozisyonda glisin aminoasidinin triptofan aminoasidi şeklinde kodlanmasına neden olduğu gösterilmiştir. (NCBI36:18:55147488:55178063:-1 referans dizi olarak kabul edilmiştir.) 4. ekzonda çocuklara ait DNA'larda bir değişim saptanamamıştır.

Aynı ailede ERGIC-53 geni 9. ekzonunun SSCP taramasında ise baba ve iki çocuğunda farklı bant profili tespit edilmiş, DNA Dizi Analizi sonucunda ise çocuklardan birinde 9. ekzonda 202. kodonda arjininden stop kodonuna (R202X) bir değişim tespit edilmiştir.



Şekil 6.16. Baba ve iki çocuğuna ait SSCP jel görüntüsü ve çocuğa ait DNA Dizi Analizi görüntüsü



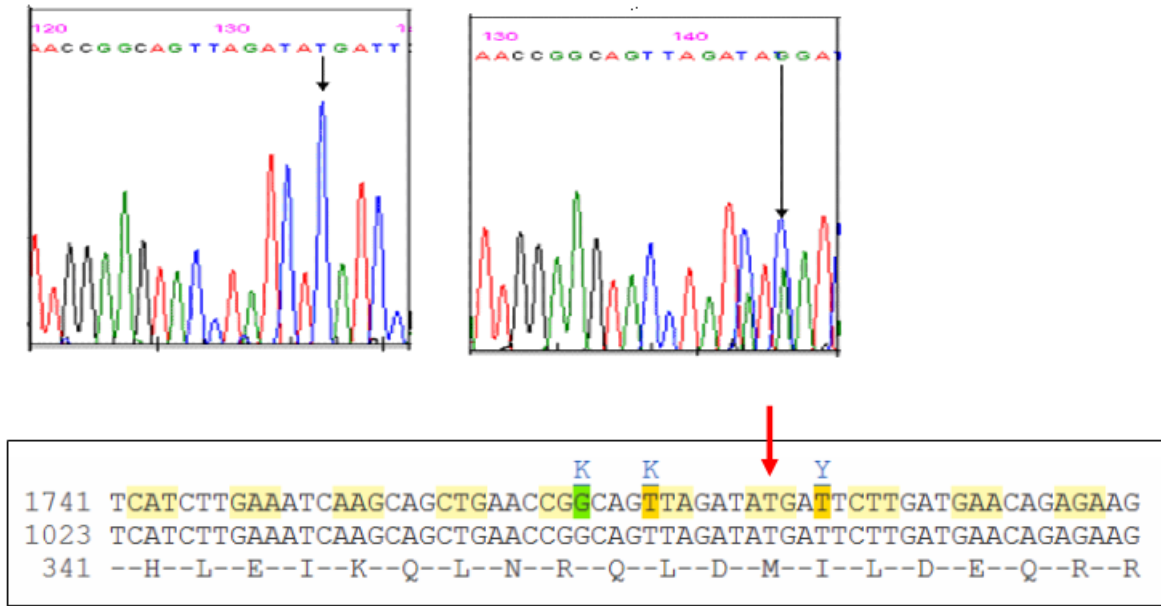
CACTTTGGTCACTTACGTTATTTCAAAAACACATATGTGTAGGTGACTCTGATCATTTTTATTATTTCCTTTTCAGCGGAG
GATAATATGCTTTATTGGAAGTGTAGGAGATCGAGAGCTAAGACAAGTCTTTGAAGGACAGAATCGTATTCATCTTGAATCAA
GCAGCTGAACCGGCAGTTAGATATGATTCCTTGATGAACAGAGAAGATATGCTCTTCTAACAGAGGAAATCTCTAAAAGAGGA
GCAGGAATGCCTGGGCAGCATGGGCAGGTGGGCTTGCAGAATATGCAGATGTGCCCCATTTACCCCTTGCTGGAAGGGAAGTAA
GAAGAAGGGCAA CTGTACTATGTGCTCATAGA

Şekil 6.17. ERGIC-53 geni ekzon 9 da değişimin meydana geldiği noktanın Ensemble veritabanı kullanılarak gösterilmesi

FV-FVIII kombine eksikliği otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalık olmasına rağmen bu çalışmada ailede compound heterozigotluk (ikili heterozigotluk) olabileceği ihtimali ortaya çıkmıştır.

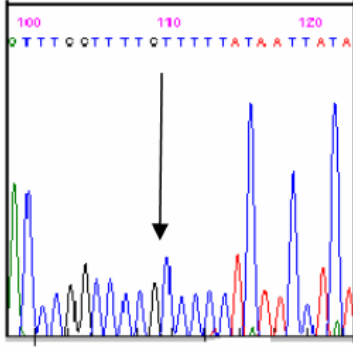
OLGU 2

FV-FVIII kombine eksikliğini taşıyan diğer bir hastada ise yine 9. ekzonda 1088. nükleotide Timin-Guanin değişimi saptanmıştır. Bu değişim proteinde 354. pozisyonda Metiyonini kodlayan TAT kodonunun Alanini kodlayan TAG kodonunu kodlamasına sebep olmaktadır. Meydana gelen yanlış anlamlı mutasyon HGMD de tanımlanmamış olup ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.



Şekil 6.18. ERGIC-53 geni 9. ekzonunun sağlıklı ve hasta bireye ait DNA Dizi Analizi görüntüleri ve referans dizi üzerinde c.1088T>G değişiminin gösterilmesi (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000074695;r=18:56995055-57027194;t=ENST00000251047)

ERGIC-53 geni 11.ekzonunda intronik bölgede ise 1570. nükleotide Sitozin Timin polimorfizmi saptanmıştır. Bu intronik değişim splice-ayırıcı bölgede bulunmamakta, proteinde herhangi bir değişime yol açmamaktadır



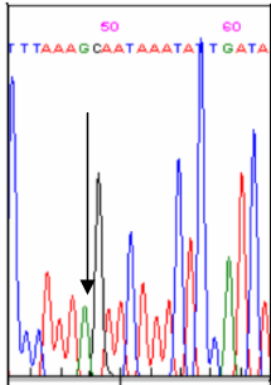
```

GTGATTTTATTGTATCAAGAGACTTTCTGTTTCAGAAATTCCA
TGAGTGAACCGTCAGACTGGTCAGTGAATGCAGCACCCCTGGCTC
TGCTGGAGGCGTCTATGAGACAACACAGCACTTCATTGACATCAAA
GAGCACCTGCACATAGTAAAGAGGGACATAGATAACTTAGTGCAGC
GAAATATGGTAACTTTGTTTCCTTTTCCTTTTATAAATTATAATCTT
TAGGAAAGGAAGAACTCATACT

```

Şekil 6.19. 1570 C>T değişimi DNA dizi analizi görüntüsü ve intronik bölgenin dizisi-değişimin gerçekleştiği baz kırmızıyla işaretlenmiştir.

ERGIC-53 geni 7. ekzonunda intronik bölgede 764. nükleotitin 86 baz gerisinde ise homozigot Adenin-Guanin polimorfizmi saptanmıştır. Bu polimorfizm NCBI (National Center Biotechnology Information) veritabanında ‘rs8095245’ olarak numaralandırılmıştır



```

TATTCTGATTTAGGGTTTTAAAAAGTGAGTTTTGGATTATTTCTAATATAA
ATCTTTCAGGTGAATTTGGTCTCTAAGCTCACAGAGTGCCATTGCCTTTA
CCAAATTAGTGCTAATTTTGTCAATTCCTCCTGGTTATTGTTATTTAAA
GCAATAAATATGATAAAATACATT

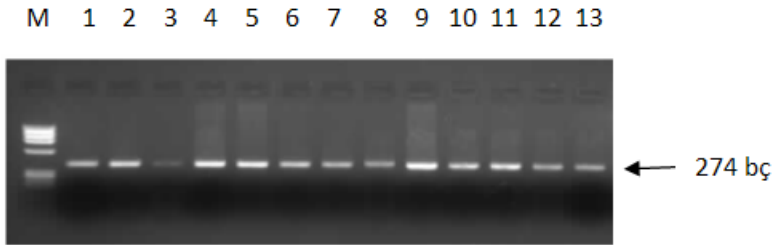
```

Şekil 6.20. 764-86 A>G değişimi ve DNA dizi analizi görüntüsü ve intronik bölgenin dizisi

6.4 MYH9 Geni Mutasyon Analizi

44 ekzona sahip MYH9 geninde literatür araştırması sonucu mutasyon sıklığı yüksek olan 7 bölge çalışılmıştır. 14 dev trombosit sendromlu hasta (Makrotrombositopeni) çalışmaya dahil edilmiştir. MYH9 genine ait 7 ekzon polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle ile amplifiye edilmiştir. Amplifiye olan örnekler %2' lik agaroz jelde 100 V'da baz uzunluklarına bağlı olarak değişen sürelerde yürütülmüştür. PCR ürünü elde edilen örnekler SSCP yöntemiyle taranarak bant farklılığı olup olmadığı tespit edilmiştir.

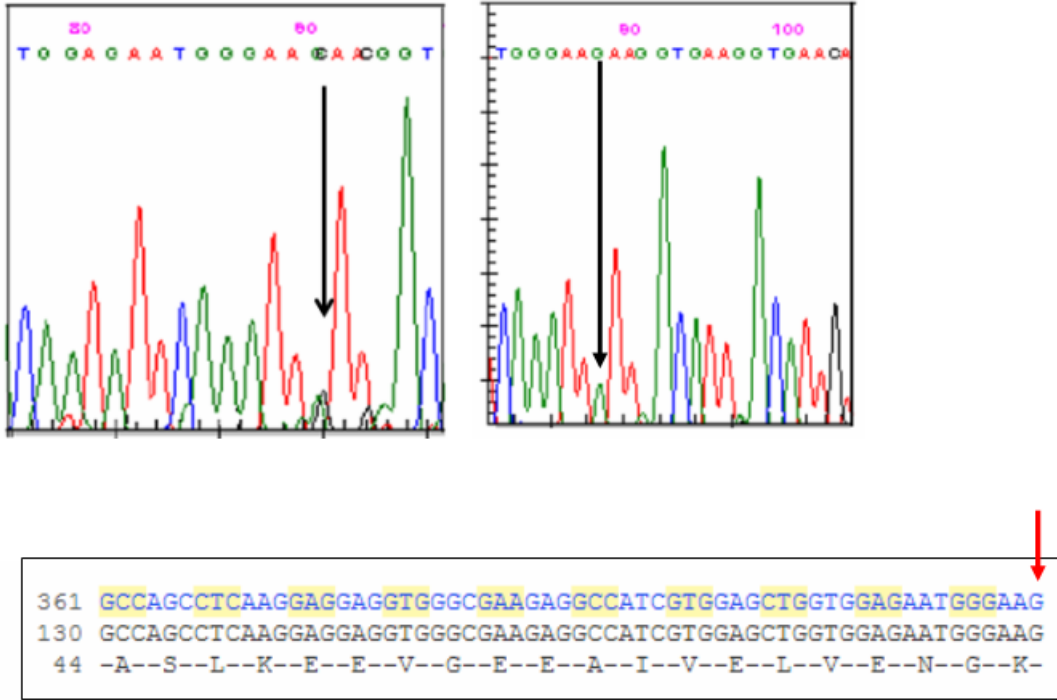
MYH9 geninde yapılan taramada sırasıyla ekzon 1, 25 ve 26'da değişimler tespit edilmiştir. Bu ekzonların PCR ürün boyutları sırasıyla 274, 470 ve 510 bp'dir.



Şekil 6.21. MYH9 geni Ekzon 1'e ait %2'lik agaroz jel görüntüsü

M: ϕ X174 DNA-HaeIII Marker, 1-13: Makrotrombositopeni hastalarına ait örnekler

Ekzon 1'de iki farklı hastada iki ayrı değişim saptanmıştır. Bunlardan ilki 197. nükleotitte Guaninden Sitozine meydana gelen değişimdir. Bu değişimde proteinde 64. pozisyonda Lizin aminoasidini kodlayan AAG kodonu, AAC kodonu şeklinde değişerek Asparajin aminoasidini kodlar haline gelmiştir. Bu yanlış anlamlı (missense) mutasyonun, insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren "Human Genome Mutation Database" (HGMD) e-veritabanında değerlendirilmesi sonucu literatürde daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış bir mutasyon olduğu belirlenmiştir. Bulunan değişimin evrimsel süreçte korunduğu "Ensembl" veritabanı kullanılarak Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Mutasyonun isimlendirilmesi HGMD kayıtlarındaki MYH9 gen dizisine göre yapılmıştır.



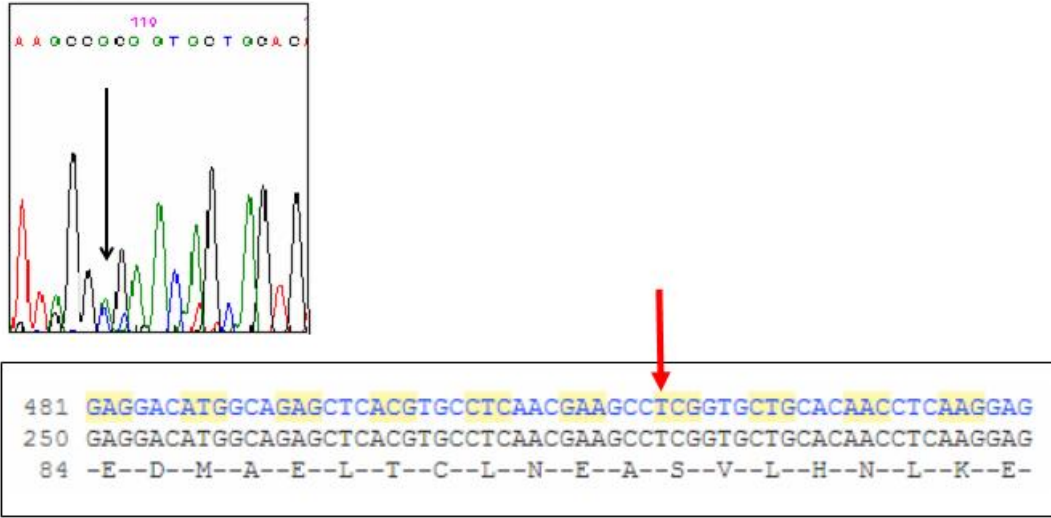
Şekil 6.22. MYH9 geni 1.ekzonda hasta bireye ait DNA Dizi Analizi görüntüsü ve MYH9 cDNA'sında K64N değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görülmektedir. K64N mutasyonuna neden olan G>C değişiminin gerçekleştiği nokta ok ile işaretlenmiştir.

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000100345;r=22:36677327-36784063;t=ENST00000216181

Çizelge 6.2. MYH9 geninin Homo sapiens'te 64. pozisyonunda yer alan Lizin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi

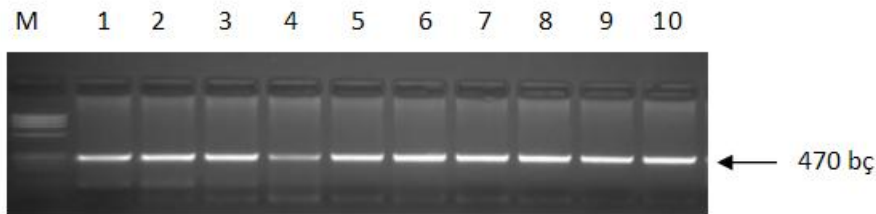
<u>Homo sapiens</u>	EPASLKEEVGEEAIVLVENG	K	KVKVNKDDIQKMNPP
<u>Mus musculus</u>	EPASLKEEVGEEAIVLVENG	K	KVKVNKDDIQKMNPP
<u>Danio rerio</u>	GFEAGSIKEETGDECLVELAD	K	IKVNKDDIQMNPP...
<u>Rattus norvegicus</u>	EPASLKEEVGEEAIVLVENG	K	IKVNKDDIQMNPP...
<u>Canis lupus familiaris</u>	EPASLKEEVGEEAIVLVENG	K	KKVNKDDIQKMNPP
<u>Cavia porcellus</u>	EPASLKEEVGEEAIVLVENG	K	VKNKDDIQKMNPP...
<u>Heterocaphalus glaber</u>	EPASLKEEVDEEAIVLVENG	K	VKNKDDIQKMNPP.

Ekzon 1 de bulunan değişimlerden bir diğeri gende 286.nükleotitte meydana gelen Timinden Guanine değişikliğine neden olan heterozigot değişimdir. T>G değişiminin proteine olan etkisine bakıldığında 96. kodonda Serinden Alanin aminoasidine dönüşerek yanlış anlamlı(missense) mutasyona neden olduğu görülmektedir. Bu değişimin Human Genome Mutation Database” (HGMD) e-veritabanında değerlendirilmesi sonucu literatürde daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış bir mutasyon olduğu belirlenmiştir.



Şekil 6.23. MYH9 geni 1.ekzonda hasta bireye ait DNA Dizi Analizi görüntüsü ve MYH9 cDNA’sında S96A değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görülmektedir. S96A mutasyonuna neden olan G>C değişiminin gerçekleştiği nokta ok ile işaretlenmiştir.

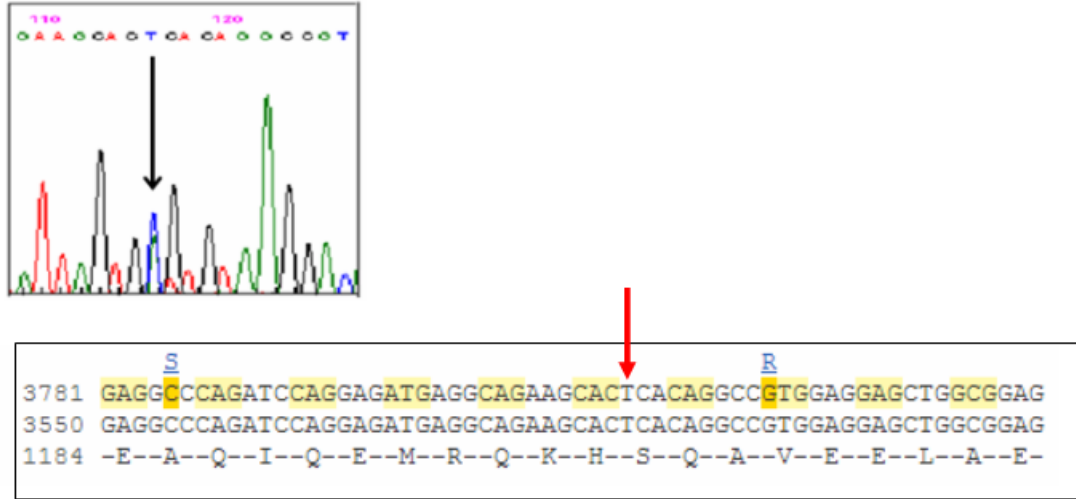
470 bç’lik bir bölge olan ekzon 25 de bir hastada PCR, DNA Dizi Analizi sonucu mutasyon saptanmıştır.



Şekil 6.24. MYH9 geni Ekzon 25’e ait %2’lik agaroz jel görüntüsü

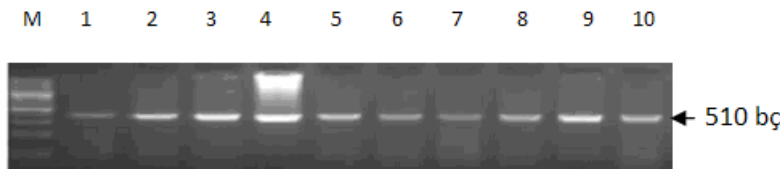
M: φX174 DNA-HaeIII Marker, 1-10: Makrotrombositopeni hastalarına ait örnekler

Ekzon 25 de 3814. nükleotide Timin'den Guanin bazına meydana gelen değişim proteinde 1195. Pozisyonda Serin aminoasinden Alanin aminoasidinin kodlanmasına neden olmaktadır. Söz konusu değişim içeren "Human Genome Mutation Database" (HGMD) e-veritabanında değerlendirildiğinde literatürde yer almadığı ilk kez bu çalışma ile saptandığı belirlenmiştir.



Şekil 6.25. MYH9 geni 25.ekzonda hasta bireye ait DNA Dizi Analizi görüntüsü ve MYH9 cDNA'sında S1195A değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görülmektedir. S1195A mutasyonuna neden olan T>G değişiminin gerçekleştiği nokta ok ile işaretlenmiştir.

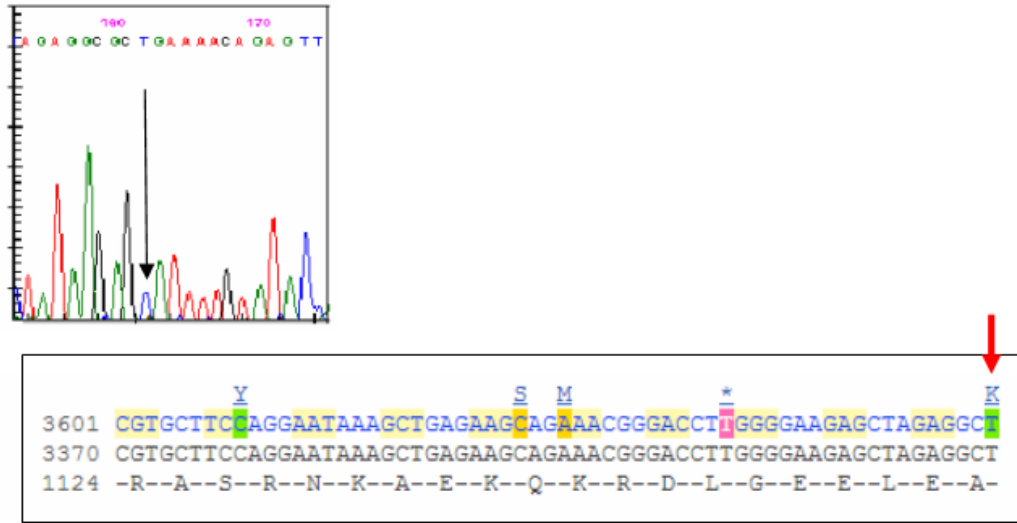
Ekzon 26 da ise iki farklı hastada 1 polimorfizm ve 2 yeni mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonlar tek bir hastada iki yeni mutasyon birlikteliği şeklinde ortaya çıkmıştır.



Şekil 6.26. MYH9 geni Ekzon 26'a ait %2'lik agaroz jel görüntüsü

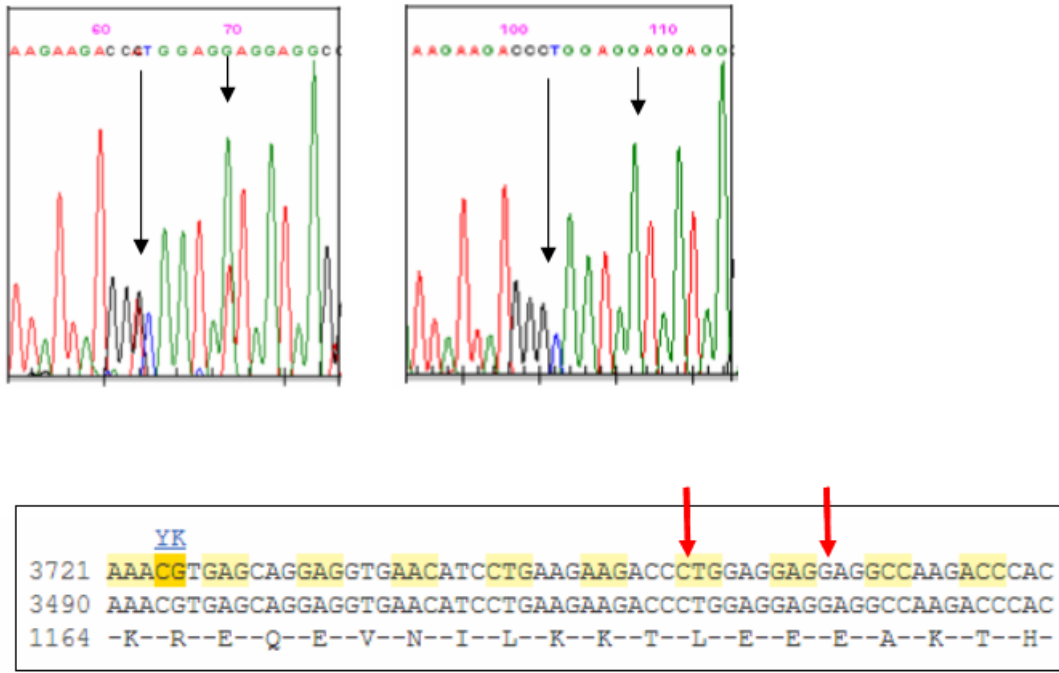
M: ϕ X174 DNA-HaeIII Marker, 1-10: Makrotrombositopeni hastalarına ait örnekler

Makrotrombositopeni hastalarından birinde ekzon 26'da daha önce Ensembl e-veritabanında rs71081 referans numarasıyla belirtilen bir polimorfizm saptanmıştır. Bu değişim 3660.nükleotitte Timin den Guanin bazına homozigot değişim şeklinde meydana gelmiştir. Proteinde 1144. pozisyonda GCT den GCG kodonuna geçişerek Alaninden Lizin aminoasidinin değişimine neden olmaktadır.



Şekil 6.27. MYH9 geni 26.ekzonda hasta bireye ait DNA Dizi Analizi görüntüsü ve MYH9 cDNA'sında A1144L değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görülmektedir. A1144L polimorfizmine neden olan T>G değişiminin gerçekleştiği nokta ok ile işaretlenmiştir.

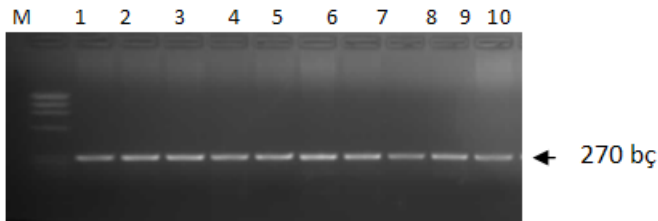
DNA Dizi Analizi sonucu 26. ekzonda yeni bir mutasyon saptanmıştır. 3756. Nükleotitte Sitozinden Adenine meydana gelen değişim proteinde Lösinden Metiyonin aminoasidinin kodlanmasına neden olmaktadır. Yine aynı ekzonda saptanan değişimin 6 nükleotit ilerisinde meydana gelen 3762 Guanin-Adenin değişimi proteinde Glutamat aminoasidinden Lizin aminoasidinin kodlanmasına neden olmaktadır.



Şekil 6.28. MYH9 geni 26.ekzonda hasta bireye ve sağlıklı kontrole ait DNA Dizi Analizi görüntüsü ve MYH9 cDNA'sında 3756 C>A (p.L1176M) + 3762 G>A (p.E1182K) değişimlerinin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görülmektedir.

6.5. FGB Geni Mutasyon Analizi

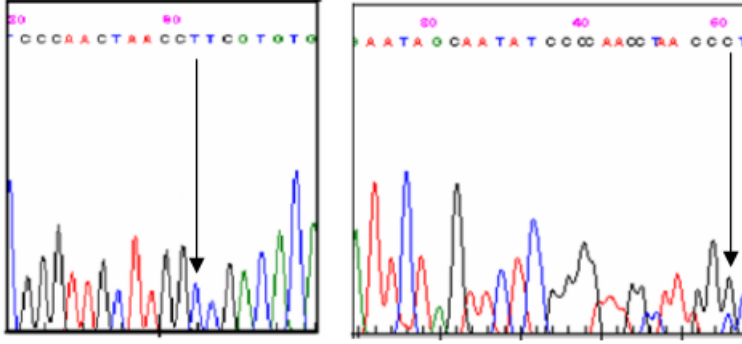
Çalışmaya 6 afibrinojenemi tanılı hasta dahil edilmiş olup FGB genine ait 7 ekzon taranmıştır. Çoğaltılan örnekler %2'lik agaroz jelde 100V'da 10 dk yürütülmüştür. PCR sonunda elde edilen ürün boyutu değişimlerin bulunduğu 4.ekzon için 270 bç. uzunluğundadır.



Şekil 6.29. FGB geni Ekzon 4'e ait %2'lik agaroz jel görüntüsü

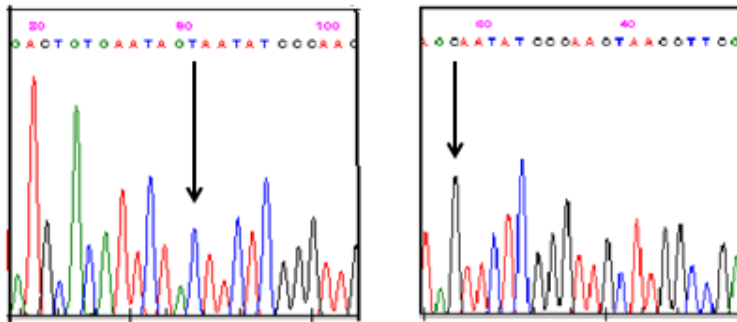
M: ϕ X174 DNA-HaeIII Marker, 1-10: Afibrinojenemi hastalarına ait örnekler

PCR yöntemiyle amplifiye edilen örnekler pürifiye edildikten sonra DNA Dizi Analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda ekzon 4’de 627. nükleotitte yer alan Timin bazının Sitozin bazına olan homozigot değişimi proteinde 189. kodonda Lösin aminoasidinin Prolin aminoasidine değişimine neden olduğu görülmüştür.

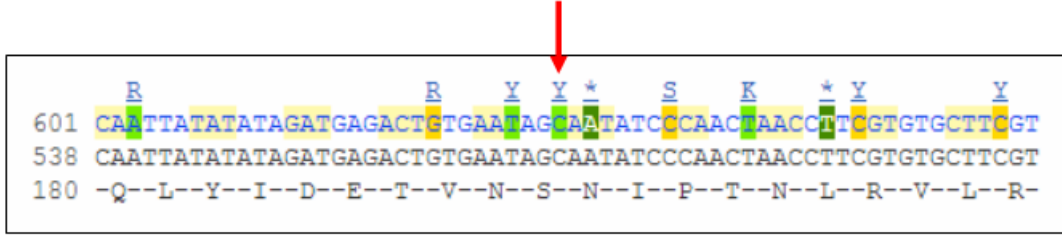


Şekil 6.30. FGB geni ekzon 4’de L189P değişimini gösteren hasta ve sağlıklı kontrole ait DNA Dizi Analizi görüntüsü

Aynı ekzonda birkaç nükleotid ilerde başka bir hastada 644. nükleotitte meydana gelen Sitozin-Timin değişimi ise ise kodonun şifrelediği 196.pozisyondaki Lösin amino asitinde herhangi bir değişiklik yapmadığından, protein ifadenmesini de etkilemeyeceği sonucuna varılmıştır.



Şekil 6.31. FGB geni ekzon 4 de 644 C>T değişimini gösteren hasta ve sağlıklı kontrole ait DNA Dizi Analizi görüntüsü



Şekil 6.32. FGB cDNA'sında L189P ve L196L değişimlerinin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görülmektedir.

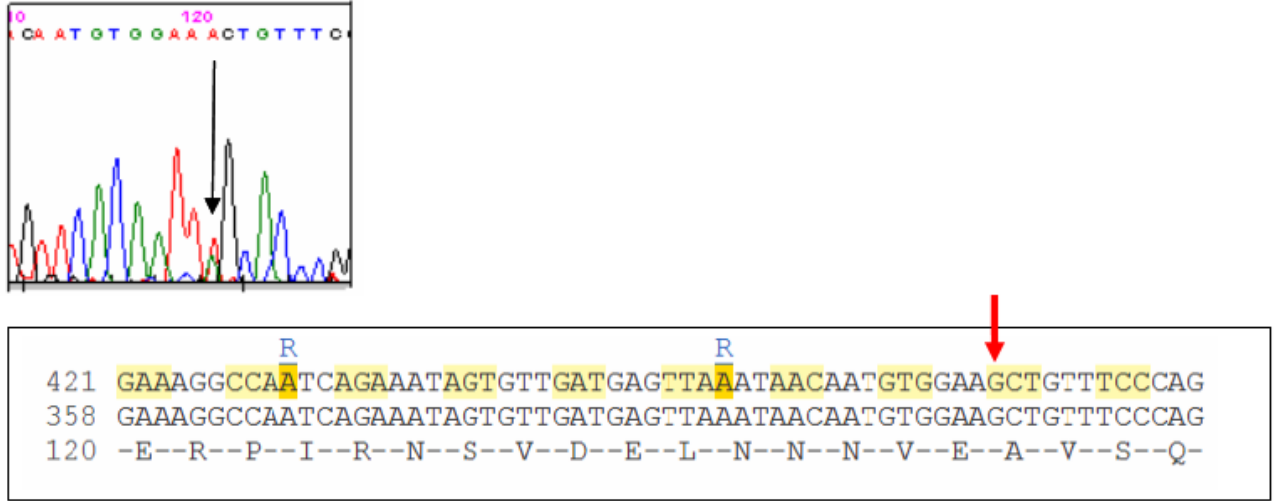
Meydana gelen L189P değişiminin genin fonksiyonu üzerinde etkisi olup olmadığını araştırmak amacıyla Expaty e-veritabanında yer alan 'Blast' (<http://web.expasy.org/cgi-bin/blast/blast.pl>) seçeneği kullanılarak türler arasında karşılaştırma yapılmış aminoasidin bulunduğu konumun genin fonksiyonu açısından önemli olduğu saptanmıştır. Aminoasidin evrimsel süreçte türler arasında korunmuş olması bu değişimin mutasyon olduğunun göstergesidir. Çizelge 4.1 de bulunan değişimin evrimsel süreçte türler arasında korunduğunu gösterilmiştir.

Çizelge 6.3. FGB geninin Homo sapiens'te 189. pozisyonunda yer alan Lösin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi

↓

Homo sapiens ...	LYIDETVNSNIPTNLRV	L	RSILENLRSKIQKLE..
Mus musculus	LYIDETVNDNIPLNLRV	L	RSILENLRSKIQKLE..
Rattus norvegicus..	LYIDETVNDNIP NLRV	L	RSILE+LRSKIQKLE..
Gorilla gorilla...	LYIDETVNSNIPTNLRV	L	RSILENLRSKIQKLE..
Canis lupus...	YI+ETV SNIPTNLRV	L	R+ILENLRSKIQKLE..
Nomascus leucogenys	LYIDETVNSNIPTNLRV	L	RSILENLRSKIQKLE..
Pongo abelii..	LYIDETVNSNIPTNLRV	L	RSILENLRSKIQKLE..
Callithrix jacchus	YIDETVNSNIPTNLRV	L	RSILENLRSK+QKLE..
Sus scrofa..	YIDETVNSNIPTNLRV	L	R+ILENLRSKI+KLE..
Bos taurus..	LYIDETV +NIPT LRV	L	RSILENLR IQKLE..

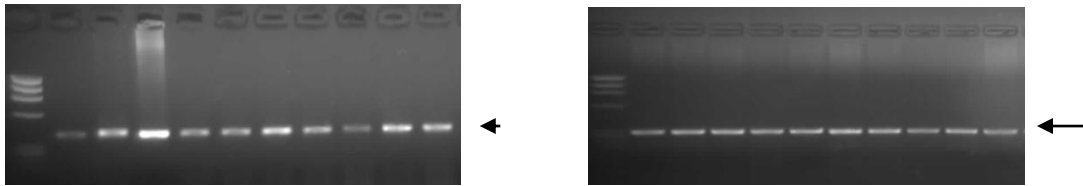
FGB geni 3. ekzon 469. nükleotitte meydana gelen heterozigot Guanin-Adenin değişimi proteinde 136. pozisyonunda Alaninden Treonin aminoasidinin kodlanmasına neden olan missense mutasyon meydana getirmektedir.



Şekil 6.33. FGB cDNA'sında A136T değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ve aminoasit dizisi

6.6 Glikoprotein IIB Geni (ITGA2B) Mutasyon Analizi

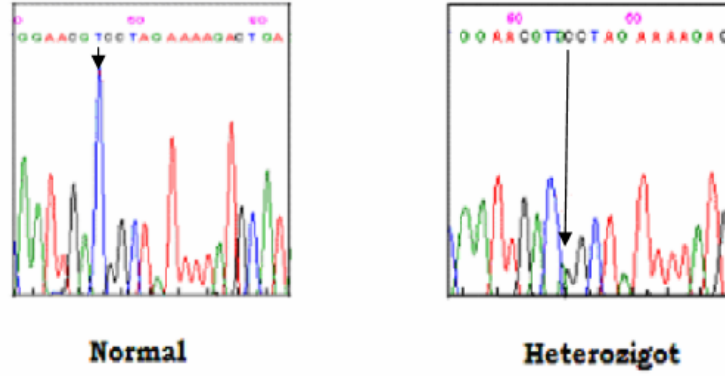
Çalışmaya 20 Glanzmann Trombasteni (GT) tanısı almış hasta dahil edilmiştir. Hastalar ve kontrol grubunda 35 ekzonlu GpIIB geni polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle amplifiye edilmiştir. Amplifiye olan örnekler %2' lik agaroz jelde 100 V'da baz uzunluklarına bağlı olarak değişen sürelerde yürütülmüştür. Bu gen taramasında süre kaybı yaşanmaması için hasta grubu SSCP taramaları yapılmadan amplifiye olan örneklerin pürifikasyonları yapılarak direkt DNA Dizi Analizi yapılmıştır. Bu taramalar sonucunda 4 farklı bölgede 5 tanesi ilk defa bu çalışmada tanımlanmış olan toplam 7 değişim tespit edilmiştir. Değişim bulunan bölgeler ekzon 4, ekzon 13, ekzon 19 olup bu bölgelerden ekzon 4 ve ekzon 13; ekzon 4-1,4-2 ve ekzon 13-1, 13-2 şeklinde iki bölgeye ayrılarak her bölge için 2 çift primerle taramaları yapılmıştır. Bu bölgeler sırasıyla 213+147, 353+281, 169 bp'lik uzunluğa sahiptir.



Şekil 6.34. GpIIB geni Ekzon 4-1 ve Ekzon 4-2'e ait %2'lik agaroz jel görüntüsü

M: ϕ X174 DNA-HaeIII Marker, 1-10: GT hastalarına ait örnekler

Jelde yürütülen örneklerin pürifikasyonu yapıldıktan sonra sekansları yapılmıştır. DNA Dizi Analizi sonucu ekzon 4 de 468. nükleotide meydana gelen Timin-Guanin değişimi 147. kodonda Valin'den Glisin aminoasit değişimine neden olmaktadır.

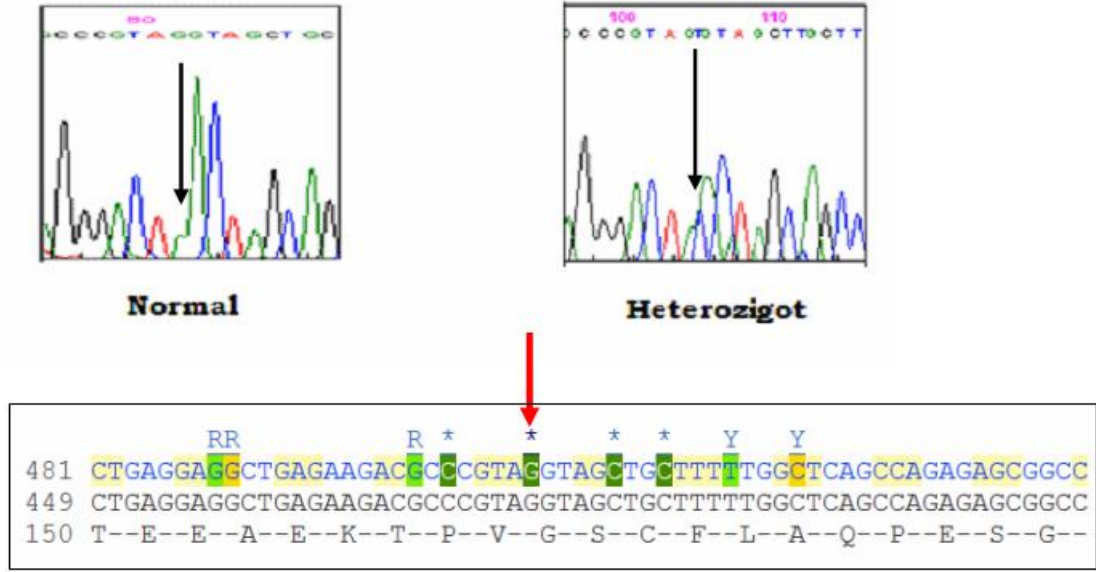


```
421 GCTGGAGCGA*RCGTCATTGTGGCCTGCG*CCC*CTGGCAGCAMCTGGAACGTCSCTAGAAAAGA
389 GCTGGAGCGACGTCATTGTGGCCTGCGCCCCCTGGCAGCACTGGAACGTCCTAGAAAAGA
130 S--W--S--D--V--I--V--A--C--A--P--W--Q--H--W--N--V--L--E--K--
```

Şekil 6.35. GpIIB geni ekzon 4 DNA Dizi Analizi görüntüleri , c.468 T>G p. V147G değişimi

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000005961;r=17:42449548-42466873;t=ENST00000262407)

Aynı ekzonda 39 nükleotit ilerde 507. pozisyonda meydana gelen heterozigot Timin-Guanin değişimi proteinde 159. Pozisyonda Glisinden Valin aminoasidine değişime neden olmaktadır.



Şekil 6.36. GpIIB geni ekzon 4 DNA Dizi Analizi görüntüleri , c.507G>T, p. G159V değişimi

Ekzon 4’de görülen 468 T>G değişimi HGMD’de daha önce tanımlanmamış bir değişim olup bu değişimin mutasyon olup olmadığını araştırmak için daha önceki taramalarda da kullanılan Polyphen adlı internet tabanlı bir program kullanılmıştır. Bu program dizinin evrim boyunca korunmuşluğunu proteinin tahmini yapısını göz önüne alarak hesaplamaktadır. Yapılan hesaplama sonucunda dizide olan aminosit ile değişim sonucu oluşan aminosit için bir skor elde edilmektedir. Bu skor değeri 2 den büyükse değişimin proteini hasara uğrattığı sonucu ortaya çıkmaktadır. 468 T>G değişimi için elde edilen skor (PSIC Score difference) 2.082 olarak bulunmuştur, bundan dolayı bu değişim mutasyon olarak nitelendirilmektedir. Çizelge 5.1, bulunan değişimin evrimsel süreçte türler arasında korunduğunu göstermiştir.

Çizelge 6.4. GpIIB geninin Homo sapiens'te 468. pozisyonunda yer alan Valin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi

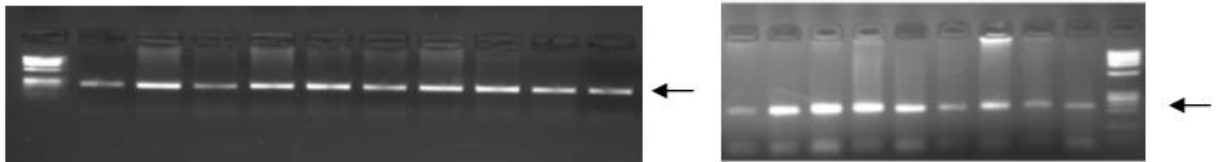
Homo sapiens	..FLPEPEQPSRLQDPVLVSCDSAPCT	V	VQCDLQEMARGQRAMVTVLAFLWLP..
Canis familiaris	..SLPGSSQPSGLQDPVLLSCKSGPHT	V	VQCELQEMARGQRAMVKVLAFLQLP..
Mus musculus	..FLPKPGQ---QDPVLVSCDSASCT	V	VECELREMV RGQRAMVTVQAMLGLS.
Oryctolagus cuniculus	..LEPQPSSAAGPRDPVLVSCDSAPCT	V	VQCELQEMARGQRAMVTVLALLGLS..
Rattus norvegicus	..S-PQGSKQTEQQDPVLVSCNSAPCT	V	VECELQEMV RGQRAMVTVQATLGLS..
Danio rerio	..LEPQGSSAAGPQDPVLVSCDSAPCT	V	VQCELQEMARGQRAMVTVLALLGLS..
Sus scrofa	..VLPGQKQPSSLQDPILLSCDSAPCT	V	VHCDLPEMARGQRAMVTAQAFWLWP..
Equus caballus	..FLPGPMQPSRLQDPVLVNCDSAPCT	V	VQCELEEMARGQRAMVTVRAFVWLP..
Xenopus laevis	FTKGDEKPPR-NHTVLLNCSSAPHT	V	VQCSVQNLERGGRATVTVHSILWVP.

PolyPhen

<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>

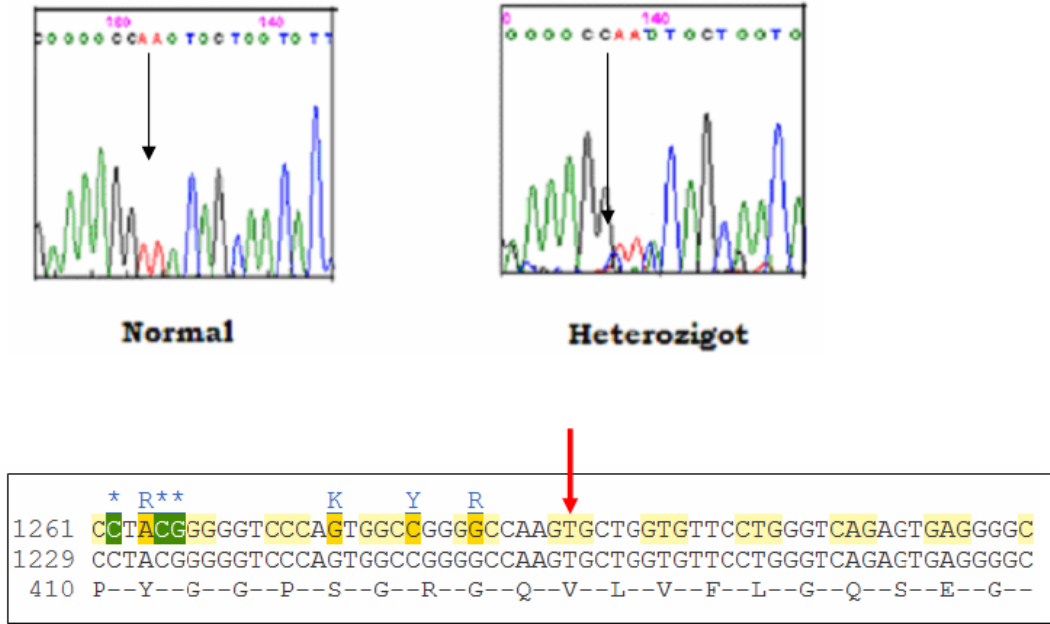
Ekzon 4 de bulunan c. 507T>G değişimi ise literatürde daha önce Nelson ve ark.'ları (*PMID:16359515*) tarafından 2005 yılında belirtilmiş olup HGMD' de *CM054765* erişim numarasıyla belirtilmiştir.

Değişim bulunan bir diğer bölge ekzon 13 dür. Ekzon 13; 634 bç'lik bir bölge olup 353 ve 281 bç'lik iki bölge şeklinde taranmıştır. 20 GT hastası için ekzon 13 amplifiye edildikten sonra pürifiye edilmiş ve PCR ürünleri sekanslanmıştır.



Şekil 6.37. GpIIB geni Ekzon 13-1 ve Ekzon 13-2'e ait %2'lik agaroz jel görüntüsü

GpIIB geninde Ekzon 13’ de Valin’in Lösin’e değişimine neden olan bir Guanin – Timin değişimi 1291. nükleotitte saptanmış olup değişim Val420Leu olarak isimlendirilmiştir. Proteinde 420. pozisyonda Valin’i kodlayan GTG kodonu Lösin’i kodlayan TTG kodonu durumuna gelmiştir. Bu değişimin HGMD ‘de daha önce tanımlanmamış olduğu görülmüştür ve bu çalışmada ilk kez tanımlanmıştır. Değişimin mutasyon olup olmadığı Polyphen programıyla saptanmış, programa göre mutasyon olarak değerlendirilebilirlik skoru 2.194 olarak bulunmuştur.



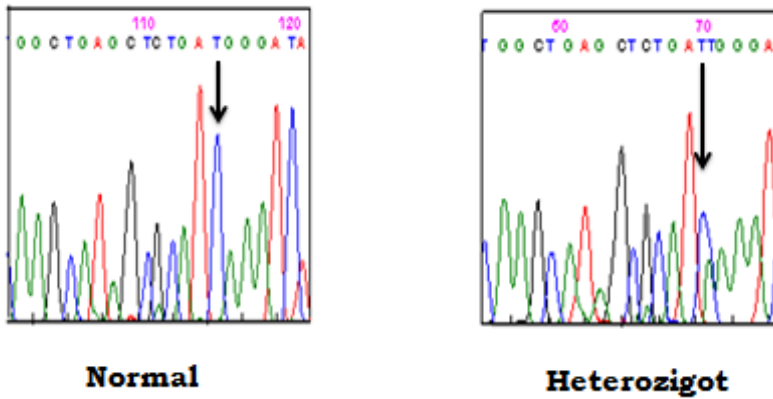
Şekil 6.38. GpIIB geni ekzon 13 DNA Dizi Analizi görüntüleri , c.1291 G>T p. V420L değişimi

Çizelge 6.5. GpIIB geninin Homo sapiens'te 420. pozisyonunda yer alan Valin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi

Homo sapiens	..DGYNDIAVAAPYGGPSGRGQ	V	LVFLGQSEGLRSRPSQVLDS..
Mus musculus	..DGYNDIAVAAPYGGPSGQGQ	V	VLIFLGQSEGLSPRPSQVLDS...
Rattus norvegicus	..DGYNDVAVAAPYGGPSGQGQ	V	LIFLGQSEGLSPRPSQVLDS...
Equus caballus	..DGFNDIAIAAPYGGEDKKG	V	YIFNGRSTGLNSVPSQILE...
Canis lupus familiaris	..DGYNDIAIGAPFAGKDQRGQ	V	LIYNGNKDGLNRKPSQIL...
Sus scrofa	..DGYNDVAVAAPYGGPTGQGQ	V	SVFLGQSEGLNSQPSQVLHS...
Bos taurus	..DGYNDVAVAAPCGGPNQGQ	V	LVYLGQSEGLNPSPSQVLDS...
Gallus gallus	..DGYNDIavgapfagedRRGK	V	LIYNGYSNGLKTDPSQVLN ..
Anolis carolinensis	..DGYNDIAIGVPFAGKDQRGK	V	LIYNGNARGLHSHKPSQVL..
Pongo abelii	..DGYNDIAVAAPYGGPSGRGQ	V	LVFLGQSEGLSSRPSQVLDS..

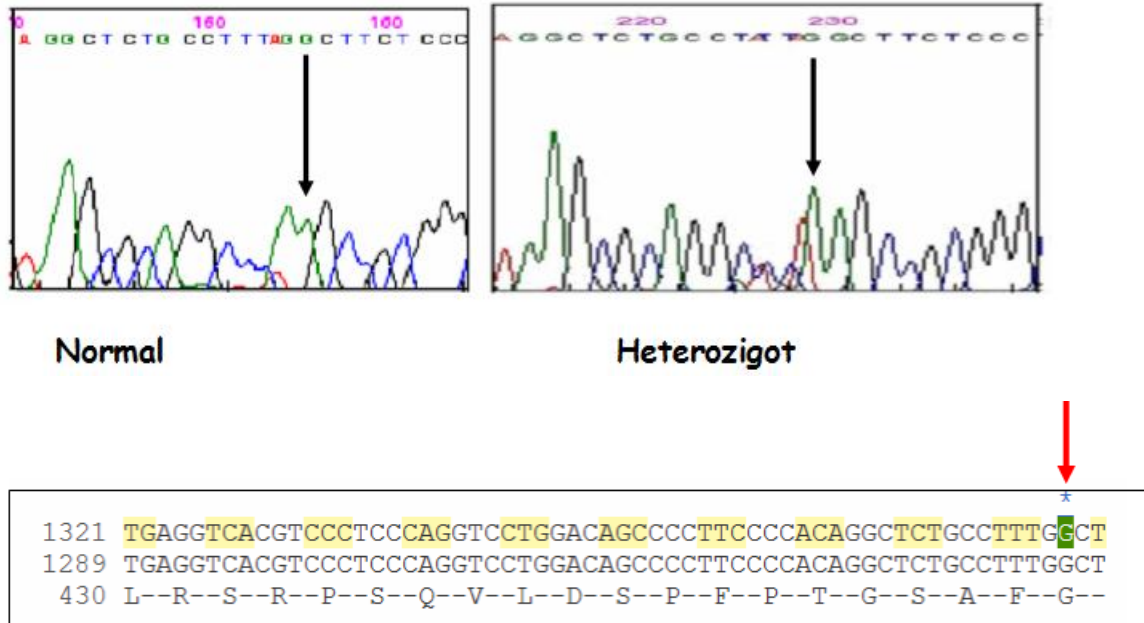
Polyphen programına göre Val420Leu değişimi için elde edilen skor (PSIC Score difference) 2.194 olarak bulunmuştur, bundan dolayı bu değişim mutasyon olarak nitelendirilmektedir.

GpIIB geninde 14. Ekzonun başlangıç noktasından 107 baz gerisinde intronik bölgede heterozigot Timin-Guanin değişimi saptanmıştır. Bu değişimin adlandırılabilmesi için ileri fonksiyonel analizlerin yapılması gerekmektedir.



Şekil 6.39. GpIIB geni intronik bölgede meydana gelen T>G değişiminin DNA Dizi Analizi görüntüleri

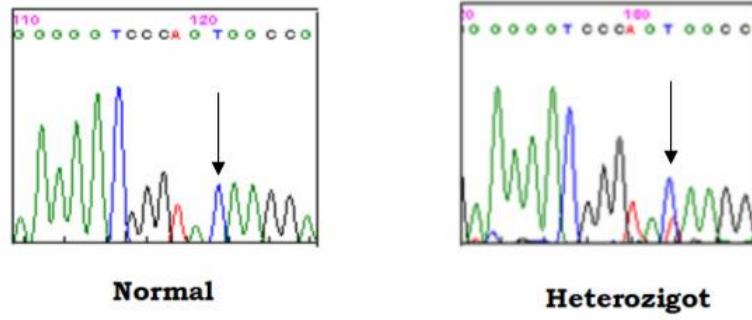
GpIIB geni 13. ekzonda bir hastada tespit edilen 1378. nükleotitte meydana gelen Timin-Adenin değişimi proteinde 448.pozisyonda Fenilalaninden Treonin aminoasidine değişime neden olmaktadır.



şekil 6.40. GpIIB geni ekzon 13 de meydana gelen P448T değişimine ait DNA Dizi Analizi görüntüleri

Bu değişim daha önce literatürde tanımlanmış bir mutasyon olup HGMD e-veritabanında *CM940990* erişim numarasıyla bulunmaktadır.

Aynı ekzonda farklı bir hastada 1277. nükleotitte meydana gelen heterozigot Timin-Adenin değişimi kodonda GTG nin GAG olarak kodlanmasına neden olmaktadır. Bu kodlama proteinde 415.pozisyonda Serin aminoasidinin Arjinin aminoasidine değişimiyle sonuçlanmaktadır.



```

      * R**      K      Y      R
1261 CCTACGGGGGTCCCATGGCCGGGGCCAAGTGCTGGTGTTCCTGGGTGAGAGTGAGGGGC
1229 CCTACGGGGGTCCCATGGCCGGGGCCAAGTGCTGGTGTTCCTGGGTGAGAGTGAGGGGC
410  P--Y--G--G--P--S--G--R--G--Q--V--L--V--F--L--G--Q--S--E--G--

```

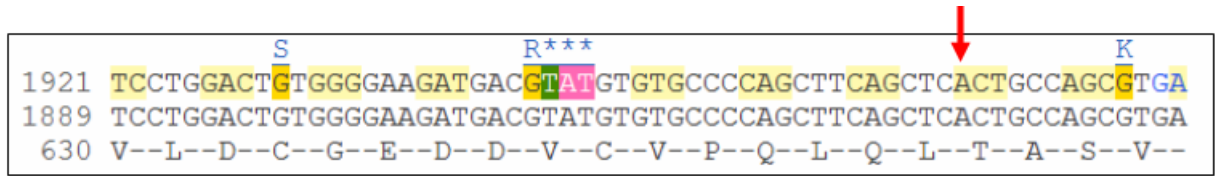
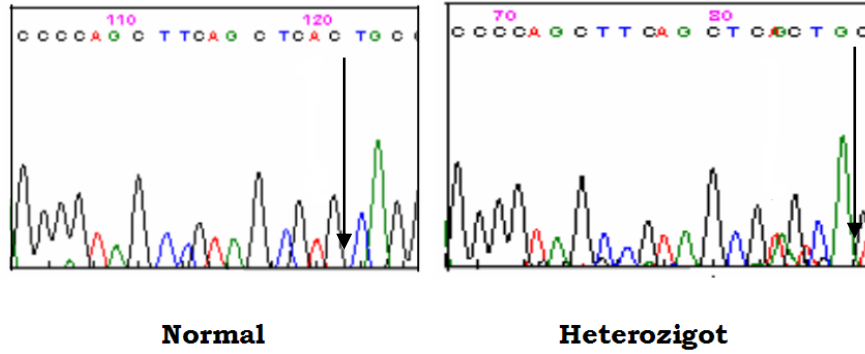
Şekil 6.41. GpIIB geni ekzon 13 de meydana gelen S415A değişimine ait DNA Dizi Analizi görüntüleri

Bu değişim literatürde daha önce tanımlanmamış bir değişim olup mutasyon olup olmadığı daha önceki deneylerde kullanılan Polyphen e-veritabanıyla kesinleştirilmiştir. Bu veritabanına göre değişimin evrimsel süreçte türler arasında korunmuş olduğu görülmüş ve Polyphen (PSIC Score difference) değişim skoru 2.872 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 6.6. GpIIB geninin Homo sapiens'te 415. pozisyonunda yer alan Serin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi

Homo sapiens	..SAIAPLGDLDRDGYNDIAVAAPYGGP	S	GRGQVLVFLGQSEGLRSRPSQVLDSPFPT ..
Mus musculus	..SAIAPLGDLNRDGYNDIAVAAPYGGP	S	GQGQVLIFLGQSEGLSRPSQVLDSPFPT ..
Equus caballus	..SAIAPLGDLNRDGYNDVAVAAPYGGPD	S	GRGQVLVFLGQSEGLSSHPSQVLDSPFST..
Canis lupus familiaris	..SAIASLGDLDLRDGYNDVAVAAPYGGPS	S	LGQVLVYLGQSEGLSRPSQILDSPFPA...
Bos taurus	..SAIAPLGDLNRDGYNDVAVAAPCGGPN	S	GQGQVLVYLGQSEGLNPSPSQVLDSPF..
Sus scrofa	..SAIAPLGDLNRDGYNDVAVAAPYGGPT	S	GQGQVSVFLGQSEGLNSQPSQVLHSPFAA ..
Pongo abelii	..SAIAPLGDLDRDGYNDIAVAAPYGGPS	S	GRGQVLVFLGQSEGLRSRPSQVL..
Rattus norvegicus	..SAIAPLGDLDRDGYNDIAVAAPYGGPS	S	GRGQVLVFLGQSEGLRSRPSQVL...
Anolis carolinensis	..SAIAPLGDLDRDGYNDIAVAAPYGGP	S	GRGQVLVFLGQSEGLRSRPSQVLDSPFPT ..
Gallus gallus	..SAIAPLGDLDRDGYNDIAVAAPYGGP	S	GRGQVLVFLGQSEGLRSRPSQVLDSPFPT..

Missense mutasyonlardan bir diğeri ise gende 19. ekzonda 1921. nükleotide meydana gelen CAC kodonunun CGC şeklinde kodlanmasına neden olan heterozigot birdeğişimdir. Bu değişimin proteinde etkisine bakıldığı zaman 646.pozisyonda yer alan Treonin aminoasidinin Alanin aminoasidi şeklinde kodlandığı görülmüştür.



Şekil 6.42. GpIIB geni ekzon 14 de 1921 A>G değişimine ait DNA Dizi Analizi görüntüleri

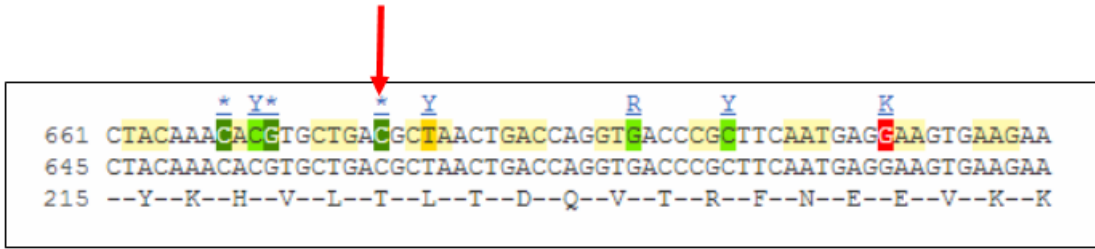
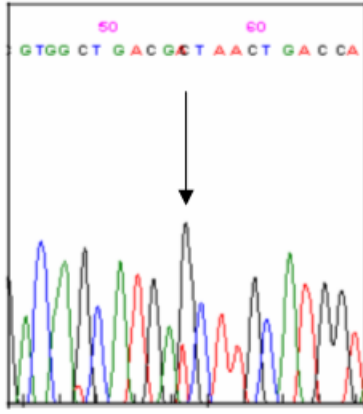
HGMD e-veritabanında daha önce tanımlanmamış olan bu değişim evrimsel süreçte türler arasında korunmuş olup değişimin mutasyon olduğu Polyphen e-veritabanı (PSIC score difference: 2.356) ve NCBI Multipl Alignment Tool veritabanıyla kesinleştirilmiştir.

Çizelge 6.7. GpIIB geninin Homo sapiens'te 646. pozisyonunda yer alan Treonin aminoasidinin diğer türlerdeki aminoasit dizisi

Homo sapiens	..SNVEGFERLICNQQKENE	T	RVVLCELGNPMKKNAQIGIAML..
Mus musculus	..SNIEGFERLVCTQKKENE	T	RVALCELGNPMKKDTRIGITML..
Canis lupus familiaris	..SNIEGFERLICNQQKENE	T	KIVLCELGNPMKRNRARIGITML ..
Rattus norvegicus	..SNVKGFERLVCTQKKENE	T	RLALCELGNPMKKDTRIGITML ..
Bos taurus	..SNMEGFERLICNQQKENE	T	KVVLCELGNPMKSNAQIEVMM..
Sus scrofa	..SNVEGFERLICNQQKENE	T	RVVLCELGNPMKKNAQIGIAML..
Danio rerio	..SNVEGFERLICNQQKENE	T	RVVLCELGNPMKKNAQI.....
Papio cynocephalus	..SNVEGFERLICNQQKENE	T	RVVLCELGNPMKKNAQIGIAML...
Callithrix jacchus	..SNVEGFERLICNQQKENE	T	SVVLCELGNPMKKNAQIGIAML....
Ailuropoda melanoleuca	..SNIEGFERLICNQQKENE	T	KMVLCELGNPMKRNRARIGITML...

6.7. Glikoprotein IIIA Geni (ITGB3) Mutasyon Analizi

Çalışmaya Glanzmann Trombasteni tanısı almış 12 hasta ve 90 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. GpIIB ile ilişkili GpIIIA geni 32 ekzondan oluşmaktadır ve çalışmanın bu bölümünde mutasyon sıklığı yüksek olan 4 ekzon belirlenerek hasta ve sağlıklı kontrol grupta gen taraması yapılmıştır. Tarama sonucunda 5.ekzonda HGMD'de daha önce tanımlanmamış bir değişim tespit edilmiştir. Bu değişim 680. nükleotitte yer alan Adenin bazından Sitozin bazına heterozigot değişim şeklindedir. Değişimin protein üzerine etkisine bakıldığında 221. pozisyonunda Lösin aminoasidinin izolösin aminoasidinin kodlanmasına neden olduğu görülmüştür.



Şekil 6.43. GpIIIA geni ekzon 5 de meydana gelen 680 A>C değişimine ait DNA Dizi Analizi görüntüsü

7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Gen taramalarında ortaya konulan mutasyonların ve gen değişimlerinin ne kadar risk getirdiğinin saptanması amacıyla ‘‘IBM SPSS Statistics 20 for Ki Kare’’ programı kullanılmıştır. Ki-Kare tablolarında farklılık var mı sorusunu test ederken %5 yani 0,05 yanılma payı ile çalışılarak anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

7.1. Pediatrik inmeli hastalarda PCI Gen Taramasına İlişkin

			Durum		Toplam	Ki-Kare	p
			Değişim Bulunan	Değişim Bulunmayan			
PCI gen taraması	Hasta Grubu	N	6	84	90	3,030	0,143
		% Hastalık	6,7	93,3	100,0		
		%Durum	75,0	43,8	45,0		
	Kontrol Grubu	N	2	108	110		
		% Hastalık	1,8	98,2	100,0		
		%Durum	25,0	56,3	55,0		
Toplam		N	8	192	200		
		% Hastalık	4,0	96,0	100,0		
		%Durum	100,0	100,0	100,0		
Pediatrik inmeli hastalarda PCI İçin Odds Değeri						3,857	

Tablo 7.1. Pediatrik inme hasta ve sağlıklı kontrol grubunda p ve OR değeri

Çalışmaya dahil edilen 90 hasta ve 110 sağlıklı kontrol için değerlendirme yapıldığında; klinik olarak inme teşhisi almış 90 hastadan % 6.7 sinde genetik değişim saptanırken %93.3 genetik olarak bir değişim saptanamamıştır. 110 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunda ise bireylerin % 1.8 inde genetik bir değişim saptanırken %98.2 si kliniğe uygun şekilde sağlıklıdır. Sütun bazında değerlendirme yapıldığında ise değişim saptanan hastaların % 75 i hasta grubunda iken % 25’i sağlıklı kontrol grubunda yer almaktadır. Sağlıklı bireylerden seçilen kontrol grubunda ise % 43.8’i hastalıkla ilişkili bulunurken % 56.3’ü gerçekten kontrol grubu olarak kabul edilebileceği saptanmıştır.

Uygulanan Ki-Kare analizi sonucunda PCI geni için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$). Anlamlı bir farklılık tespit edilemediğinden dolayı Odds değerinin yorumlanması doğru değildir.

7.2. Homosistinüri hastalarında CBS Gen Taramasına İlişkin Analiz

			Durum		Toplam	Ki-Kare	P
			Değişim Bulunan	Değişim Bulunmayan			
Hastalık CBS	Hasta Grubu	N	3	7	10	27,835	0,001*
		% Hastalık	30,0	70,0	100,0		
		%Durum	100,0	7,2	10,0		
	Kontrol Grubu	N	0	90	90		
		% Hastalık	0,0	100,0	100,0		
		%Durum	0,0	92,8	90,0		
Toplam		N	3	97	100		
		% Hastalık	3,0	97,0	100,0		
		%Durum	100,0	100,0	100,0		
Homosistinürili hastalarda CBS Değeri						-	

Tablo 7.2. Homosistinüri hasta ve sağlıklı kontrol grubunda p ve OR değeri

Klinik olarak homosistinüri tanısı almış 10 hasta ve 90 sağlıklı kontrolde yapılan CBS gen taraması sonucu 3 hastada genetik bir değişim saptanmıştır. Kontrol grubunda ise kliniğe uygun olacak şekilde herhangi bir değişim saptanamamıştır.

Uygulanan Ki-Kare analizi sonucunda istatistik olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (Ki-Kare:27,835, $p:0,001$). Ancak varsayımlar sağlanamadığından dolayı Odds değeri hesaplanamamıştır.

7.3. FV- FVIII Kombine Eksikliği Hastalarında ERGIC53 Gen Taramasına İlişkin Analiz

			Durum		Toplam	Ki-Kare	P
			Değişim Bulunan	Değişim Bulunmayan			
FV-FVIII ERGIC53	Hasta Grubu	N	6	10	16	33,888	0,000*
		% Hastalık	37,5	62,5	100,0		
		%Durum	100,0	10,5	15,8		
	Kontrol Grubu	N	0	85	85		
		% Hastalık	0,0	100,0	100,0		
		%Durum	0,0	89,5	84,2		
Toplam		N	6	95	101		
		% Hastalık	5,9	94,1	100,0		
		%Durum	100,0	100,0	100,0		
FV-FVIII'li hastalarda ERGIC53 için Odds Değeri						-	

Tablo 7.3. FV-FVIII kombine eksikliği olan hasta ve sağlıklı kontrol grubunda p ve OR değeri

Klinik olarak FV-FVIII kombine eksikliği tanısı almış 16 hasta ve 85 sağlıklı kontrolde yapılan istatistiki araştırmada hasta grubunda olanların % 37.5 inde genetik bir değişim saptanırken %62.5 'inde herhangi bir değişim saptanamamıştır. Kontrol grubunda ise kliniğe uygun şekilde bir değişim saptanmamış olup sağlıklı olma oranı %100 dür. Uygulanan Ki-Kare analizi sonucunda istatistik olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (Ki-Kare:33,888, p:0,000). Ancak varsayımlar sağlanamadığından dolayı Odds değeri hesaplanamamıştır.

7.4. Makrotrombositopeni Hastalarında MYH9 Gen Taramasına İlişkin Analiz

			Durum		Toplam	Ki-Kare	P
			Değişim Bulunan	Değişim Bulunmayan			
Makro trombositopeni MYH9	Hasta Grubu	N	7	18	25	27,399	0,000*
		% Hastalık	28,0	72,0	100,0		
		%Durum	100,0	16,4	21,4		
	Kontrol Grubu	N	0	92	92		
		% Hastalık	0,0	100,0	100,0		
		%Durum	0,0	83,6	78,6		
Toplam		N	7	110	117		
		% Hastalık	6,0	94,0	100,0		
		%Durum	100,0	100,0	100,0		
Makrotrombositopeni hastalarında MYH9 İçin Odds Değeri						-	

Tablo 7.4. Makrotrombositopeni olan hasta ve sağlıklı kontrol grubunda p ve OR değeri

Çalışmaya dahil edilen 25 hasta ve 92 sağlıklı kontrolle yapılan taramanın istatistikî değerlendirilmesi sonucunda hasta grubunun % 28' inde genetik değişim saptanırken, klinik olarak tanı konulmuş olmasına rağmen % 72sinde herhangi bir genetik değişim saptanamamıştır. Kontrol grubunda ise kliniğe uygun şekilde bir değişim saptanamamış olup sağlıklı olma oranı % 100 dür. Uygulanan Ki-Kare analizi sonucunda MYH9 geni için istatistik olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (Ki-Kare:27,399, p:0,000). Ancak varsayımlar sağlanamadığından dolayı Odds değeri hesaplanamamıştır.

7.5. Afibrinojenemi Hastalarında FGB Gen Taramasına İlişkin Analiz

			Durum		Toplam	Ki-Kare	P
			Değişim Bulunan	Değişim Bulunmayan			
Afibrinojenemi FBG	Hasta Grubu	N	5	6	11	34,494	0,000*
		% Hastalık	45,5	54,5	100,0		
		%Durum	83,3	6,3	10,9		
	Kontrol Grubu	N	1	89	90		
		% Hastalık	1,1	98,9	100,0		
		%Durum	16,7	93,7	89,1		
Toplam		N	6	95	101		
		% Hastalık	5,9	94,1	100,0		
		%Durum	100,0	100,0	100,0		
Afibrinojenemi hastalarında FGB İçin Odds Değeri						74,167	

Tablo 7.5. Afibrinojenemi olan hasta ve sağlıklı kontrol grubunda p ve OR değeri

Klinik olarak afibrinojenemi tanısı almış 11 hasta ve 90 sağlıklı kontrolle yapılan FGB gen taraması istatistiki olarak değerlendirildiğinde hasta grubunun % 45.5'inde genetik olarak bir değişim saptanırken, % 54.5'i genetik olarak herhangi bir değişime sahip değildir. Kontrol grubunda ise % 1.1 inde değişim saptanmıştır. Değerler sütun bazında değerlendirildiğinde değişim bulunanların %83.3'ü hasta grubunda iken % 16.7 si kontrol grubundadır. Sağlıklı kontrol olarak çalışmaya dahil edilen hastaların % 6.3'ünde herhangi bir genetik değişim saptanırken % 93.7 si genetik ve klinik olarak gerçekten sağlıklı bireylerdir. FGB gen taramasına ait uygulanan Ki-Kare analizi sonucunda istatistik olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (Ki-Kare:34,494, p:0,000). FGB genindeki değişim hastalık için 74.167 kat risk getirmektedir.

7.6 Glanzmann Trombasteni (GT) hastalarında GpIIB Gen Taramasına İlişkin Analiz

			Durum		Toplam	Ki-Kare	P
			Değişim Bulunan	Değişim Bulunmayan			
GT GpIIB	Hasta Grubu	N	8	12	20	38,824	0,000*
		% Hastalık	40,0	60,0	100,0		
		%Durum	100,0	11,8	18,2		
	Kontrol Grubu	N	0	90	90		
		% Hastalık	0,0	100,0	100,0		
		%Durum	0,0	88,2	81,8		
Toplam		N	8	102	110		
		% Hastalık	7,3	92,7	100,0		
		%Durum	100,0	100,0	100,0		
GT hastaları için GpIIB için Odds Değeri						-	

Tablo 7.6. Glanzmann trombasteni sendromlu hasta ve sağlıklı kontrol grubunda p ve OR değeri

GT tanısı almış 20 hasta ve 90 sağlıklı kontrolde yapılan GpIIB gen taraması istatistiki olarak değerlendirildiğinde hasta grubunun % 40'ında genetik olarak bir değişim saptanırken kontrol grubunda kliniğe uygun olarak bir değişim saptanmamıştır. Sütun bazında sonuçlar değerlendirildiğinde değişim bulunanların %100 ü hasta grubunda iken % 11.8 i sağlıklı olarak bulunmuştur, kontrol grubunda ise bu oran % 88.2 dir. GpIIB gen taramasına ait uygulanan Ki-Kare analizi sonucunda istatistik olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (Ki-Kare:38,824, p:0,000). Ancak varsayımlar sağlanamadığından dolayı Odds değeri hesaplanamamıştır.

7.7. Glanzmann Trombastenili hastalarda GpIIIa Gen Taramasına İlişkin Analiz

			Durum		Toplam	Ki-Kare	p
			Değişim Bulunan	Değişim Bulunmayan			
GT GpIIIa	Hasta Grubu	N	1	11	12	7,574	0,118
		% Hastalık	8,3	91,7	100,0		
		%Durum	100,0	10,9	11,8		
	Kontrol Grubu	N	0	90	90		
		% Hastalık	0,0	100,0	100,0		
		%Durum	0,0	89,1	88,2		
Toplam		N	1	101	102		
		% Hastalık	1,0	99,0	100,0		
		%Durum	100,0	100,0	100,0		
GT Hastalarında GpIIIa İçin Odds Değeri						-	

Tablo 7.7. Glanzmann trombasteni sendromlu hasta ve sağlıklı kontrol grubunda GpIIIa geni için p ve OR değeri

Klinik olarak GT tanısı konulmuş 12 hasta ve 90 sağlıklı kontrolde yapılan analiz sonucu hasta grubunun % 8.3 oranla genetik değişim saptadığı ve %91.7 de ise herhangi bir değişim olmadığı saptanmıştır. GpIIIa geni için uygulanan Ki-Kare analizi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$).

8. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde insan genetiği üzerine yapılan araştırmalarda üzerinde durulan başlıca konu genlerdeki mutasyonların belirlenmesi, bu mutasyonların bireyler/populasyonlar arasındaki farklılıklarının saptanması ve bunların olası etkileşimlerinin belirlenmesidir. Genetik hastalıklar araştırılırken öncelikle klinik olarak bilinen hastalıkla ilişkili geni tanımlanmakta ikinci etapta hasta gruplarında belirlenen gen taranarak mutasyonların tespiti yapılmakta ve klinikle desteklenen genetik sonuçlarla da hastalığın tedavisinde yol alınmaktadır. Belirlenen mutasyonlar tüm dünyada şimdiye dek tanımlanan bütün mutasyonları içeren bir veritabanı ile /Human Genome Mutation Database değerlendirilmekte ve farklı veritabanları kullanarak ilgili genlerin ürünlerinin yapı ve işlevleri, mutasyonun yarattığı etki incelenerek sonuçlar değerlendirilmektedir.

Bu çalışmada Türk populasyonunda nadir görülen hematolojik hastalıklar çalışılmıştır ve sonuçlar yukarıda belirtilen veritabanları ile birlikte 1996 yılında kurulan “Rare Bleeding Disorders Database” takip edilerek değerlendirilmiştir.

Bu çalışmanın ilk grubunu pediatrik inme grubundaki hastalar oluşturmaktadır. İnme, gelişmiş ülkelerde ölüme neden olan hastalıklar arasında üçüncü sıradadır ve ayrıca erişkin sakatlığının da en sık nedenlerindedir. İnme ile ilgili çok fazla klinik araştırma yapılmış olmasına rağmen inmeye yatkınlık oluşturan genetik faktörlerin saptanması ve bireye özgü tedavilerin uygulanmasına yönelik çalışma çok azdır. Bu çalışmada 90 pediatrik inme tanısı almış çocukta PCI gen taraması yapılmıştır ve çalışma sonucunda 2 yeni mutasyon tanımlanmıştır. Çalışmada FV Leiden 1691 G>A mutasyonu bakımından heterozigot, pediatrik inme tanısı almış, 5 yaşındaki erkek çocukta bu gende ilk defa tanımlanan bir mutasyon tespit edilmiştir. Faktör V Leiden mutasyonu venöz tromboembolik olayların şimdiye kadar saptanmış en yaygın genetik risk faktörüdür ancak bu vakada dikkat çekici olay çocuğun babasında da aynı mutasyonun tespit edilmiş olmasıdır. Çocuğun öyküsüne bakıldığında donörü babası olacak şekilde kemik iliği transplantasyonu geçirmiş olduğu görülmüştür. Çocuğun transplantasyon öncesi DNA’sı PCI geninde bu mutasyon açısından tarandığında herhangi bir değişime rastlanılmamıştır. Bu durum transplantasyon öncesi mutasyon taşımayan olgunun transplantasyon sonrası donörden (babası), hiperkoagülabileiteye yol açabilecek iki farklı genden mutasyon aldığını göstermiştir. Koagülasyon kaskadında yer alan proteinlerde

meydana gelen defektlerin transplantasyonla donörden alıcıya geçmiş olabileceği ve klinik açısından bu durumun önemli olabileceği bu çalışmayla gösterilmiştir. Ayrıca 2001 yılında Crawford ve ark.'ları kemik iliği transplantasyon sonrası stroke (inme) oluşumu ile ilgili yaptıkları araştırmada inmenin meydana gelmesinin BMT (kemik iliği transplantasyonu) geçiren insanlarda genel popülasyona göre çok daha sık olduğunu, çalışmalarına dahil ettikleri 36 hastada bu oranın %3 civarında olduğunu belirtmişlerdir (144). Bu çalışma; PCI geni ile pediatrik inme arasındaki olası ilişkiyi ortaya koyan ilk çalışma olması bakımından önemlidir.

Hematolojik hastalıklardan Hemofili A ve Hemofili B toplumlarda en sık görülen kanama hastalıklarıdır. Bunlarla beraber von Willebrand faktör hastalığı da Faktör VIII 'de ikincil defektle ilişkili primer hemostaz defektidir. Ve bu 'X' e bağlı hastalıklar tüm kalıtsal koagülasyon faktör eksikliklerinin % 95-97'sini oluşturmaktadır. Geri kalan % 3-5 ise daha nadir görülen yaygın kalıtsal hastalıklardır. Bu grup fibrinojen, protrombin, FV, kombine FV+FVIII, FVII, FX, FXI ve FXIII eksikliklerini içerir ve bu hastalıklar otozomal resesif kalıtım göstermektedirler. Hastalıkların prevalansı Batı toplumlarında 1/500000 veya daha az iken Ortadoğu ülkelerinde, Güney Hindistan gibi akraba evliliklerinin çok olduğu toplumlarda 10 ila 20 kat fazladır. Yapılan araştırmalar değerlendirildiğinde tüm dünyada FXI ve FVIII %37 ve % 23 oranla en sık görülen nadir hematolojik hastalıklar iken bunları sırasıyla %10 ile FV ve fibrinojen eksikliği, % 9 ile FX eksikliği, % 6 ile FXIII eksikliği, %3 ile kombine FV+FVIII eksikliği ve % 2 ile FII eksikliği takip etmektedir. İlk defa 1954'de tanımlanan orta derecede kanamalara yol açan bir hastalık olan Faktör V ve Faktör VIII kombine eksikliği (F5F8D) milyonda bir görülür ve otozomal resesif geçiş gösterir. Bu hastalığın kadın ve erkeklerde görülme sıklığı eşittir. Akraba evliliklerinin daha çok görüldüğü Ortadoğu ülkelerinde prevalansı yüksektir. Şimdiye kadar dünyada 60 ailede 100 den daha az insanda ortaya çıkan bu hastalık burun kanamaları, doğum sonrası ve cerrahi müdahaleler sonrası kanamalar, vücutta kolay morarmaya neden olan semptomlara sahiptir.

Homosistein, diyetle alınan ve endojen proteinlerden sentezlenen, hem protein sentezi hem de S-Adenozilmetiyoninin (SAM) oluşmasını sağlayan madde olan metiyoninden metabolize olan thiol'lü esansiyel bir aminoasittir. Homosistein düzeyinin dengelenmesi ise remetilasyon yoluyla yapılabildiği gibi CBS enziminin görev aldığı transsülfürasyon yolu ile de sağlanmaktadır. CBS enziminin katalizlediği reaksiyonla homosistein

sisteine indirgenir. CBS aktivitesinin azalmasıyla ilişkili olan bir grup çalışma konumuzu oluşturan Mudd ve ark.'ları tarafından 1995 de ortaya koyulan homosisteinürüdür.

Homosisteinürinin prevalansı 1/200000- 1/335000 olarak rapor edilmiştir. Ülkelere göre prevalanslara bakıldığında 2010 yılında Katarda yapılan araştırmada 1:18000, 1995 de İrlanda da yapılan araştırmada 1:1800, 2001 de Almanyada 1:17800 ve 2004'de Norveçte yapılan araştırmada ise 1:16400 olarak belirtilmiştir.

CBS geninde en sık görülen mutasyonlardan biri enzimin 7. intronunun 3' ucu ve 8. ekzonunun 5' ucu arasında olan 68 bç'lik bir insersiyon (844ins68)dur. Akar ve ark. (1998) tromboz oluşturma riskleri için CBS 844ins68 ve MTHFR 677CT mutasyonlarına Türk toplumunda araştırmışlardır. Tromboz oluşumu için MTHFR677CT'nin ve CBS 844ins68'in bazı koşullarda bir risk faktörü olduğunu göstermişlerdir (143). Grossmann ve ark. (2002) yaptığı çalışmada CBS 844ins68'in ve MTFHR 677CT mutasyonunun derin ven hastaları için bir risk faktörü olmadığını saptamışlardır. Kondrad ve ark. (2004) sigara, hipertansiyon, düşük B₁₂ seviyesi ya da folat seviyesindeki eksikliğin homosistein seviyesini etkilediğini ortaya koymuşlar ve CBS 844ins68 mutasyonu ile homosistein seviyeleri arasında bir korelasyon kuramamışlardır. Dilley ve ark.'ları 2001 yılında yaptıkları çalışmada miyokard enfaktüslü hastalarda CBS 844ins64 mutasyonunun bir risk faktörü olmadığı bulunmuştur (Dilley ve ark. 2001). Zhang ve Dai'nin (2001) yaptıkları çalışmada mutasyonun enzim aktivitesini etkileyerek homosistein düzeyini azalttığını ve vasküler tromboembolik hastalıklara karşı koruyucu bir etkisi olduğunu saptamışlardır (144). Akar ve ark.'larının 2008 yılında yaptıkları çalışmada homosistein düzeyi ve CBS 844ins64 mutasyonu arasında anlamlı bir istatistiki değer elde edilemeyerek mutasyonun herhangi bir etkisi olmadığı görülmüştür. 844ins68 ile birlikte CBS geninde en sık görülen mutasyonlardan bir diğeri de 833 T>C missense mutasyonudur. Bilindiği gibi homosisteinin sisteine metabolize olduğu major organlardan biri karaciğerdir. Barouki ve ark.'larının 2009'da yaptıkları çalışmada insanda karaciğerde CBS mRNA sının 833T>C ve 844-845ins68 ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır (145).

2013 yılında CBS üzerine yapılan bir araştırmada ise CBS in kristalize yapısı üzerinde inceleme yapılmış, CBS in S-adenozilmetiyonin (SAM) için iki bağlanma bölgesi içerdiği, CBS aktivasyonunun regölasyonunun ve stabilitesinin SAM tarafından sağlandığını gösterilmiştir. Genetik hastalıklarda proteinlere ligandların etkisi araştırılarak yeni farmakolojik stratejilerin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu alışmada CBS geninde ilk defa tanımlanan 110 bç'lik insersiyon gende daha önce aynı bölgede tanımlanan 844ins68 mutasyonu ile referans diziyile karşılaştırıldığında dizilerin birbiri üzerine çakışmadığı görölmüştür. 844ins68'in homosistein metabolizmasına olan etkisi bilinmektedir. Çalışmada saptanan 110 bç'lik insersiyon homosistein düzeyi ile ilişkili hastalıklarda önemli olabilir.

Pıhtılaşma sisteminde fibrin oluşumunun öncüsü olan fibrinojenin eksikliğiyle karakterize olan nadir görölen hastalıklardan afibrinojenemi hastalarında saptanan kanamalar hemofili hastalarına oranla daha az şiddetli olmaktadır. Bu durumun trombositlerde normal düzeylerde olan GpIIB –IIIA reseptörlerinin von Willebrand faktör tarafından bağlanarak agregasyona katkıda bulunduğu böylece kanamanın daha az şiddetli olduğu sanılmaktadır. Hastalığın yaklaşık %20'sinde çeşitli genetik mutasyonlar tanımlanmıştır. şimdiye kadar tanımlanan mutasyonlardan en sık göröleni missense mutasyonlardır ve bunlar A44C, G45C,A74C, A98T, A190S, A196C, L202G, A285C, T296T, G377A, L383A, G430A, G444S, T467T, T492L mutasyonları, literatürde splice mutasyon olarak 3 mutasyon tanımlanmıştır bunlar IVS1 as -600 A>G, IVS6 ds +13 C>T ve IVS7 ds +1 G>T mutasyonlarıdır. Bu çalışmada tanımlanan mutasyonlar ise literatürde daha önce tanımlanmamış olup bu çalışmada ilk defa saptanmış mutasyonlardır. Gende 4.ekzonda 644. nükleotitte meydana gelen değişim molekülün aminoasit dizilimini değiştirmeyip aynı aminoasiti kodladığı için hastalığa neden olabilecek değişim olarak düşünölmemektedir.

FV-FVIII kombine eksikliği çoğunlukla akraba evliliği öyküsü olan ailelerin çocuklarında ortaya çıkan nadir görölen bir hematolojik hastalık olup yapılan araştırmalarda Orta Doğu, Güney Amerika, Avrupa ve Uzak Doğuda bir çok ölkede hastalığın varlığının yüksek olduğu saptanmıştır. En yüksek prevalansı İsrail'de yaşayan İspanyol ve Portekiz kökenli Yahudiler göstermiştir. Yapılan genetik analizlerde şimdiye kadar tanımlanan 33 mutasyon tespit edilmiştir. Bu mutasyonlardan 10 unu missense ve nonsense mutasyonlar oluşturmaktadır. Bunlar M1T, T67S, G114X,

A202X, L302T, G317X, G380X, A456X, C475A şeklinde literatüre geçmiştir. Bu çalışmada bulunan mutasyonlar ise Türk populasyonunda ilk defa tanımlanmış olup bunlar 1233delT, R202X, M354A mutasyonları ile literatürde daha önce tanımlanan intronik değişimler olan 1570 C>T değişimi ve 764-86 A>G değişimleridir. FV-FVIII kombine eksikliği otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalık olmasına rağmen bu çalışmada bulunan R202X/1233delT mutasyonları ile hastalığın compound (ikili) heterozigot kalıtıma sahip olabileceği de gösterilmiştir. Compound heterozigotlukta anne ve baba farklı mutasyon taşıyıcıları olup bu mutasyonların çocuklarında biraraya gelme durumu sözkonusudur ve bu çalışmada da ilk defa bu durum gösterilmiştir.

FV-FVIII kombine eksikliği ile ilgili MCFD2 gen taramasında ise herhangi bir değişim saptanamamıştır.

Dev trombosit sendromu otozomal dominant kalıtım gösteren az sayıda kanama ve nötrofilik inklüzyon cisimciklerinin varlığı ile karakterize olan nadir görülen hematolojik bir hastalıktır. MYH9 geninde meydana gelen tekli aminoasit mutasyonlarının çok sayıda doku ve organda bozukluğa yol açtığı bilinmektedir. NHMCIIA ailesinden olan MYH9 geninde tanımlanmış mutasyonların aralığı 93.kodonda Arjininden (Arg⁹³) başlayıp 1933. kodonda Asparajin aminoasidi (Asp¹⁹³³) ile sonlanmaktadır. MYH9 geninde şimdiye dek tanımlanan 45 mutasyondan 8 tanesi bu çalışmayla ilişkili olan dev trombosit sendromlu hastalarda tanımlanmıştır. HGMD verilerine göre bu mutasyonlar A95T, A95A, A1165L, A1424T, I1816V, 75delG, 1204delC, 1942delT şeklindedir. Tabloda görüldüğü gibi bu çalışmada bulunan mutasyonların hepsi literatürde daha önce belirtilmemiş olup ilk defa bu araştırma ile ortaya konulmuştur. Bulunan mutasyonlardan iki tanesi aynı ekzon üzerinde 6 nükleotit arayla ‘iki yeni mutasyon birlikteliği’ şeklinde meydana gelmiştir. Bulunan mutasyonların dışında literatürde daha önce tanımlanmış olan bir polimorfizm de yine bu çalışmada gösterilmiştir.

MYH9 üzerine yapılan çalışmalarda elde edilen verilerle mutasyonlar için iki olası mekanizma belirlenmiştir. Bunlardan birisi MYH9 geninin dahil olduğu NHMCIIA sınıfında ağır zincirlerden birinin kararsız olduğundan dolayı degrade edildiği böylece hematolojik belirtilerin ortaya çıktığı, diğer bir düşünce ise dominant aktiviteye sahip olan mutant ağır zincirlerin yabancı tip ağır zincirin fonksiyonunu inhibe ettiği.

Çalışma grubunu oluşturan bir diğer hastalık olan Glanzmann Trombastenisi (GT) klinik olarak çocuk veya erken dönemde cilt ve mukozadaki kanamalarla teşhis konulan bir hastalıktır ve uzun süreli kanama zamanına sahiptir. ADP, epinefrin, trombin ve kollajen gibi fizyolojik agonistlere karşı trombositlerin agregasyonunda başarısızlıkla karakterizedir. Bu otozomal resesif kalıtıma sahip nadir görülen hastalık GpIIB- GpIIIA kompleksinde kalitatif veya kantitatif defektle oluşmaktadır. GT ile ilgili yapılan araştırmalarda hastalığın görülme sıklığının İran, Hindistan ve Ortadoğu ülkeleri gibi akraba evliliklerinin çok olduğu ülkelerde arttığı belirtilmiştir. Konuyla ilgili en kapsamlı araştırma 2004 yılında Toogeh ve ark.ları tarafından yapılmıştır ve bu çalışmada İran'dan 382 trombastani olgusunu yayınlamışlardır. Bu çalışmada, hastalara ait akrabalık ilişkisi % 87 olarak belirtilmektedir. 2006 yılında yapılan başka bir çalışmada Ürdün için 1:81.000, İsrail için 1:143.000, İran için 1:170.000 görülme sıklığı ortaya konulmuştur. Ülkemizde ise genellikle GT kliniği üzerine araştırmalar yapılmış olup genotip çalışmaları çok nadirdir. HGMD verilerine göre ülkemizden tanımlanan literatüre geçen herhangi bir mutasyon bulunmamaktadır. GpIIB geninde şimdiye dek 127 mutasyon tanımlanmıştır bu mutasyonlardan en sık görülenleri L86P, G267Z, I458M, L830R ve IVS19 ds +1 G>A mutasyonlarıdır. Ülkemizde yapılan nadir çalışmalardan biri olan bu araştırmada literatürde daha önce tanımlanmamış ilk defa bu çalışmayla 4 yeni mutasyon belirtilmiştir (Çizelge 7.4)

GT hastalarında GpIIB ile ilişkili olan GpIIIA gen taramasında ilk tanımlanan mutasyon 1992 yılında Chen ve ark'ları tarafından tanımlanan 2259. nükleotitte T>C'e meydana gelen Ser752Pro mutasyonudur. GpIIIA ile GT arasındaki ilişki ortaya koyulduktan sonra yapılan çalışmalarla günümüze dek gende 92 mutasyon tanımlanmıştır. Bu çalışmada Türklere özgü HGMD de daha önce tanımlanmamış GpIIIA geninde 1, GpIIB geninde ise 4 yeni mutasyonun ortaya konması ileride yapılacak olan çalışmalara yararlı olması açısından önem arz etmektedir.

Çalışma sonucunda bulduğumuz değişimler aşağıdaki çizelgelerde özetlenmiştir.

FGB geninde;

Çizelge 8.1. Afibrinojenemi hastalarında *FGB* geninde bu çalışmada tanımlanan mutasyonlar

Hasta	Ekzon	Değişim	Mutasyon tipi	Protein
N.T.	Ekzon 3	c. 469 G>A	Missense mutasyon	A136T
M.T	Ekzon 4	c. 617 T>S	Missense mutasyon	L189P
Y.D.	Ekzon 4	c. 644 S>T	Nonsense mutasyon	L196L

ERGIC-53 (LMAN1) geninde;

Çizelge 8.2. FV-FVIII kombine eksikliği olan hastalarda *ERGIC-53* geninde bu çalışmada tanımlanan mutasyonlar

Hasta	Ekzon	Değişim	Mutasyon Tipi	Protein
R.G.	Ekzon 4	c.1233delT	Delesyon	G157W
B.G	Ekzon 9	c. G>A	Nonsense Mutasyon	R202X
B.G.	Ekzon 9	c. 1088 T>G	Missense Mutasyon	M354A

MYH9 geninde;.

Çizelge 8.3. Makrotrombositopeni hastalarında *MYH9* geninde bu çalışmada tanımlanan mutasyonlar

Hasta	Ekzon	Değişim	Mutasyon Tipi	Protein
S.Y.	Ekzon 1	c.197G>S	Missense mutasyon	L64A
Ö.M.T.	Ekzon 1	c.286 T>G	Missense mutasyon	S96A
Y.Y.	Ekzon 25	c.3814T>G	Missense mutasyon	S1195A
M.H.C.	Ekzon 26	c.3756 C>A	Missense mutasyon	L1176M
M.H.C.	Ekzon 26	c.3762 G>A	Missense mutasyon	E1182K

GpIIB (ITGA2B) geninde;

Çizelge 8.4. GT hastalarında *GpIIB* geninde bu çalışmada tanımlanan mutasyonlar

Hasta	Ekzon	Değişim	Mutasyon Tipi	Protein
V.Ç.	Ekzon 4	c. 468 T>G	Missense mutasyon	V147G
R.Ç.	Ekzon 4	c. 507 T>G	Missense mutasyon	G159V
S.B.	Ekzon 13	c. 1277 T>A	Missense mutasyon	S415R
D.K.	Ekzon 13	c. 1291 G>T	Missense mutasyon	V420L
M.D.	Ekzon 13	c. 1378 T>G	Missense mutasyon	P448T
R.Ç.	Ekzon 19	c. 1921 A>G	Missense mutasyon	T646A

Koagülasyon yolağında önemli rollere sahip olan pıhtılaşma faktörlerinin eksikliği sonucu meydana gelen hastalıkların ilgili genlerde taranması ile mutasyon tiplerinin saptanması, fenotip/ genotip ilişkisinin ortaya konması tedavi yaklaşımlarında yol gösterici olmaktadır. Bu çalışmada nadir görülen hematolojik hastalıklarda genetik tarama yapılarak daha önce Türk popülasyonunda tanımlanmayan mutasyonlar ortaya konulmuş ve hastalar için tedavi sürecinde yol gösterici olmuştur. Bu nedenle klinik tanı ile birlikte hematolojik hastalıkların genetiğinin aydınlatılması hastaların tedavisinde önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- 1 Goodnight SH and Hathaway WE. Disorders of Hemostasis & Thrombosis: A Clinical Guide, Second Edition,2005.
- 2 Roth GJ. Platelets and blood vessels: the adhesion event. Immunol Today, 1992; 13 (3); 100-5
- 3 Perry DJ, Pasi KJ. Hemostasis and thrombosis Protocols, Humana Pres Inc, Totowa, New Jersey, 1999. 3(21);275–285.
- 4 Nurden P, Savi P, Heilmann E, Bihour C, Herbert JM, Maffrand JP, Nurden A. An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein IIb-IIIa complex function. J Clin Invest, 1995 (4); 1612-22.
- 5 Weiss HJ. Platelet physiology and abnormalities of platelet function. N Engl J Med, 1975 293 (11); 531-41.
- 6 Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Pathologic Basis of Disease,1994 5;99-110
- 7 Colman RW, Hirsh J, Moider VJ. Hemostasis And Trombosis. Basic Principles And Clinical Practice. Lippincott Williams,2004 4; 381-400.
- 8 Riddel PJ, Bradley EA, Christine M, Lillicrap DP (2007). Theories of Blood Coagulation. Journal of Pediatric Oncology Nursing,24;123–131.
- 9 Ferhanoglu B. Hemostaz Metabolizması. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Kanama ve Tromboza Eğilim Sempozyumu Dizisi, 2003 No:36, 9 – 16, İstanbul
- 10 Eigenbrot C. Structure, function, and activation of coagulation factor VII. Curr Protein Pept Sci. 2002 3(3):287-99.
- 11 Ridkel
- 12 Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin polymerization. Appraisal of the binding events that accompany fibrin generation and fibrin generation and fibrin clot assembly. Blood Coagul Fibrinolysis.1997 8: 257-267.
- 13 Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology, W.B Saunders, 1996; 463–473
- 14 Francis CW, Marder VJ. Physiologic regulation and pathologic disorders of fibrinolysis. Hum Path,1987; 18;263–274
- 15 Bithel TC. Disorders of Hemostasis and coagulation. Wintrobe's Clinical Hematology, 1993; 9;1301–1515.

- 16 Mammen EF, Thomas WR, Seegers WH. Activation of purified prothrombin autothrombin II (platelet cofactor II or autothrombin II-A). *Thromb Diath Haemorrh.*1960 5:218-49
- 17 Stenflo J. A new vitamin K dependent protein purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J. Biol. Chem.*1976 251 (2): 355-63
- 18 Mosnier LO, Griffin JH. Protein C anticoagulant activity in relation to antiinflammatory and antiapoptotic activities. *Front. Biosci.* 2006 11: 2381-99
- 19 Mather T, Oganessyan V, Hof P, Huber R, Foundling S, Esmon C, Bode W. The 2.8Å crystal structure of Gla-domainless activated protein C. *Embo J* 1996; 15(24): 6822-31
- 20 Esmon CT. Inflammation and the activated protein C anticoagulant pathway. *Semin Thromb Hemost*;2006; 1:49-60
- 21 Espana F, Medina P, Navarro S, Zorio E, Estellés A, Aznar J. The multifunctional protein C system *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents.* 2005; 3(2):119-31
- 22 Tran S, Dahlbäck B. Novel APC-cleavage sites in FVa provide insights into mechanisms of action of APC and its cofactor protein S. *J Thromb Haemost* 2010 ;8(1):129-36.
- 23 Dahlbäck B. The discovery of activated protein C resistance. *J. Thromb. Haemost.* 2003; 1 (1): 3–9
- 24 Nicolaes GA, Dahlbäck B. Congenital and acquired activated protein C resistance. *Semin Vasc Med* 2003; 3 (1): 33–46.
- 25 Akar N. Factor V 1691 G-A mutation distribution in healthy Turkish population. *Turk J Hematol*; 2009; 26:9-11
- 26 Kemkes-Matthes B. Heterozygous protein C deficiency type 1. 1989; *Blut*58 ;201-6
- 27 Esmon CT. Anticoagulant Protein C/ Thrombomodulin Pathway. *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*; 2001 (170);4327–4338.
- 28 Akar N, Arsan S, Deda G, Fitöz S, Soneltur B, Uysal Z. *Pediatric inme.* Ankara: Çocuk Hastalıkları Araştırma Vakfı Yayını, 2005, Ankara
- 29 Fukudome, K. Esmon, C. T. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem*, 1994; 269 (42); 26486-91.
- 30 Stief TW, Radtke KP, Heimburger N. Inhibition of urokinase by protein-C inhibitor (PCI): Evidence for identity of PCI and plasminogen activator inhibitor -3. *Biol Chem Hoppe-Syler* 1987; 368:1427-33

- 31 Suzuki K. The multi-functional serpin, protein C inhibitor: beyond thrombosis and hemostasis. *J Thromb Hemost* 2008; 6: 2017-26
- 32 Meijers JCM, Herwald H. Protein C Inhibitor. *Seminars in Thromb Hemost.* 2011, Vol.37;4; 349-354
- 33 Geiger M. Protein C inhibitor, a serpin with functions in- and outside vascular biology. *Thromb Haemost* 2007;97(3): 343–347
- 34 Wagenaar GTM, Uhrin P, Weipoltshammer K, et al. Expression patterns of protein C inhibitor in mouse development. *J Mol Histol* 2010;41(1):27–37
- 35 Hayashi T, Nishioka J, Nakagawa N et al. Protein C inhibitor directly and potently inhibits activated hepatocyte growth factor activator. *J Thromb Haemost* 2007 ;5(7):1477–1485
- 36 Espana F, Vicente V, Tabernero D, Scharrer I, Griffin JH. Determination of plasma protein C inhibitor and of two activated protein C-inhibitor complexes in normals and in patients with intravascular coagulation and thrombotic disease. *Thromb Res* 1990 ;59(3):593–608
- 37 Uhrin P, Schofer C, Zaujec J, et al. Male fertility and protein C inhibitor/plasminogen activator inhibitor-3 (PCI): localization of PCI in mouse testis and failure of single plasminogen activator knockout to restore spermatogenesis in PCI-deficient mice. *Fertil Steril*; 2007, 88(4, Suppl):1049–1057
- 38 Gianotten J, Schimmel AW, van der Veen F, Lombardi MP, Meijers JCM. Absence of mutations in the PCI gene in subfertile men. *Mol Hum Reprod*; 2004, 10(11):807–813
- 39 Bungum M, Giwercman A, Bungum L, Humaidan P, Rastkhani H, Giwercman YL. Polymorphisms in the protein C inhibitor gene in in vitro fertilization failure. *Fertil Steril*;2010, 93(1):277-279.
- 40 Nishii Y, Gabazza EC, Fujimoto H, et al. Protective role of protein C inhibitor in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Thromb Haemost*; 2006, 4(11):2331–2339
- 41 Hamada T, Kamada H, Hayashi T, et al . Protein C inhibitor regulates hepatocyte growth factor activator-mediated liver regeneration in mice. 2008 *Gut*;57(3):365–373
- 42 Han MH, Hwang SI, Roy DB, et al. Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets.2008 *Nature*;451(7182):1076–1081

- 43 Rosenzweig CN, Zhang Z, Sun X, et al. Predicting prostate cancer biochemical recurrence using a panel of serum proteomic biomarkers. 2009, *J Urol*;181(3):1407–1414
- 44 Suzuki K, Hayashi T. Protein C and its inhibitor in malignancy. 2007, *Semin Thromb Hemost*;33(7):667–672
- 45 Suzuki K, Deyashiki Y, Nishioka J, Kurachi K, Akira M, Yamamoto S, Hashimoto S. Characterization of a cDNA for human protein C inhibitor. A new member of the plasma serine protease inhibitor superfamily. 1997, *J Biol Chem*; 262: 611–6.
- 46 Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global burden of Disease study. 1997, *Lancet*, 349: 1269- 1276
- 47 Bonita R. Epidemiology of stroke. 1992, *Lancet*. 339: 342-344
- 48 Brown RD, Whisnant JP, Sicks JD, et al. Stroke incidence, prevalence, and survival. 1989, *Stroke*; 27: 373–380.
- 49 Korila M. Declining incidence and mortality of stroke? 1984, *Stroke* 15:225-259
- 50 Herman B, Leyten A, Van Lujik J et al. Epidemiology of stroke in Tilburg, the Netherlands. The population-based stroke registry. 1982, *Stroke* 13:629-634.
- 51 Qureshi AI, Giles WH, Croft JB, Stern BJ. Number of pregnancies and risk for stroke and stroke subtypes. 1997, *Arch Neurol.*; 54: 203–206
- 52 Sheinart KF, Tuhim S, Horowitz DR, et al. Stroke recurrence is more frequent in Blacks and Hispanics. *Neuroepidemiology*, 1998; 17: 188–198
- 53 Ortel TL. Genetics of coagulation disorders. *Genetics of Cerebrovascular Disease*; 1999, 129–156
- 54 Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, et al. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*; 2002, 360: 1903–1913
- 55 Rodriguez BL, D’Agostino R, Abbott RD, et al. Risk of hospitalized stroke in men enrolled in the Honolulu Heart Program and the Framingham Study: a comparison of incidence and risk factor effects. 2002, *Stroke*; 33: 230–236.
- 56 Tuomilehto J, Rastenyte D. Diabetes and glucose intolerance as risk factors for stroke. 1999, *J Cardiovasc Risk*; 6: 241–24
- 57 Loh E, Sutton MS, Wun CC, et al. Ventricular dysfunction and the risk of stroke after myocardial infarction. 1997, *N Engl J Med*; 336: 251–257

- 58 Nadareishvili ZG, Rothwell PM, Beletsky V, et al. Long-term risk of stroke and other vascular events in patients with asymptomatic carotid artery stenosis. 2002, Arch Neurol; 59: 1162–1166
- 59 Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. Blood. 1998; 91: 288–294.
- 60 Hillbom M, Numminen H, Juvela S. Recent heavy drinking of alcohol and embolic stroke. 1999, Stroke; 30: 2307–2312.
- 61 Novak K. NIH increase efforts to tackle obesity. 1998, Nat Med; 4: 752–753.
- 62 Gillum RF, Mussolino ME, Ingram DD. Physical activity and stroke incidence in women and men. 1996, Am J Epidemiol; 143: 860–869.
- 63 Wald DS, Bishop L, Wald NJ, et al.. Randomized trial of folic acid supplementation and serum homocysteine levels. 2001, Arch Intern Med; 161: 695–700.
- 64 Neiman J, Haapaniemi HM, Hillbom M. Neurological complications of drug abuse: pathophysiological mechanisms. 2000, Eur J Neurol ; 7: 595–606
- 65 Hankey GJ, Eikelboom JW, van Bockxmeer FM, et al . Inherited thrombophilia in ischemic stroke and its pathogenic subtypes. 2001, Stroke ; 32: 1793–1799
- 66 Viscoli CM, Brass LM, Kernan WN, et al. A clinical trial of estrogen-replacement therapy after ischemic stroke. 2001, N Engl J Med; 345: 1243–1249.
- 67 Thorvaldsen P, Aspuld K, Kuulasma K et al .Stroke incidence ,case fatality and mortality in the WHO Monica Project.Stroke; 1995, 26:361-7.
- 68 Utku U, Çelik Y. Strokta Etyoloji, Sınıflandırma ve Risk Faktörleri. Balkan S (Editör). Serebrovasküler Hastalıklar.2005, Ankara Güneş Kitabevi.
- 69 Vigneaud V, Riegel B. The isolation of homocysteine and its conversion to a thiolactone. 1935, J Biol Chem; 112:149-154
- 70 Hankey G, Eikelboom JW. Homocysteine And Vascular Disease. 1999, The Lancet, 354(31); 407-413.
- 71 Bolander CG. Focus On Homocysteine And The Vitamins Involved In Its Metabolism.2002, Springer Bussiness Media Gmbh, 262, France.
- 72 Mudd SH, Levy HL, Kraus JP. Disorders Of Transsulfuration. The Metabolic & Molecular Bases Of Inherited Disease. 2007, 8th Ed. (2); 56
- 73 Prasad K. Homocysteine, a risk factor for cardio-vascular disease. 1999, Int J Angiol; 8: 76-86.

- 74 Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and athero-thrombosis. 1998, *New Eng J Med*; 338: 1042-1050
- 75 Banerjee R, Evande R, Ojha S, Taoka S. Reaction mechanism and regulation of cystathionine b-synthase. 2003,*Biochimica et Biophysica Acta*; 1647: 30-35.
- 76 Sucu M, Karadere A, Toprak N. Homosistein ve kardiyovasküler hastalıkları. *Türk Kardiyol Dern.* 2001;29:181-90.
- 77 Mudd S, Skovby F, Levy H, Pettigrew K, Wilcken B, Pyeritz R, Andria G, Boers G, Bromberg I, Cerone R, Fowler B, Grobe H, Schmidt H, Schweitzer L. The Natural History Of Homocystinuria Due To Cystathionine β -Synthase Deficiency. 1985, *Am.J.Hum.Genet.*, 37; 1-31.
- 78 Bostom AG, Lathrop L. Hyperhomocysteinemia In Endstage Renal Disease: Prevalence, Etiology And Potential Relationship To Arteriosclerotic Outcomes. 1997, *Kidney Int*, 52; 10-20
- 79 Korenberg J, Kawashima H, Pulst S, Ikeuchi T, Ogasawara N, Yamamoto K, Schonberg S, West R, Allen L, Magenis E. Molecular Definition Of A Region Of Chromosome 21 That Causes Features Of The Down Syndrome Phenotype. 1990, *Am J Hum Genet.*, 47(2); 236-46
- 80 Carson N, Cusworth D, Dent C, Field C, Neill D, Westall R. Homocystinuria: A New Inborn Error Of Metabolism Associated With Mental Deficiency. 1963,*Arch Dis Child*, 38:425-36.
- 81 Kluitjmans LA, Boers GHJ, Verbruggen B, Trijbels FJM, Novakova IRO, Blom HJ. Homozygous Cystathionine B Synthase Deficiency, Combined with Factor V Leiden or Thermolabile Methylentetrahydrofolate Reductase in the Risk of Thrombosis Haemostasis. *Blood*, 1998, 91, 6; 207-214
- 82 Rosenblatt D. Methylentetrahydrofolate Reductase. *Clin. Invest Med*, 2001, 24; 56-59.
- 83 Daly S, Molloy A, Mills J et al. The Influence of 5,10 Methylentetrahydrofolate Reductase genotypes On Enzyme Activity In Placental Tissue. *Brit J Obstet Gynaec*, 1999, 106; 1214-1218
- 84 Stern L, Bagley P, Rosenberg I et al. Conversion Of 5-Formyltetrahydrofolic Acid is Unimpaired in Folate- Adequate Persons Homozygous For The C677T Mutation in The Methylentetrahydrofolate Reductase Gene. *J Nutr*, 2000,130;2238-2242.
- 85 McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nat Med*,1996,;2:386-9.

- 86 Tsai MY, Bignell M, Schwichtenberg K, Hanson N. High Prevalence Of A Mutation In The Cystathionine β -Synthase Gene. *Am.J.Hum.Genet*, 1996, 59; 1262-1267
- 87 Kraus J, Janosik M, Kozich V, Mandell R, Shih V, Sparandeo MH, Sebastio G, Franchis R, Andria G, Kluitjmans L, Blom H, Boers GHJ, Gordon RB, Kamoun P, Tsai MY, Kruger WD, Koch HG, Ohura T, Gaustadness M. Cystathionine Beta Synthase Mutations in Homocystinuria. *Human Mut.*, 1999, 13:362.375
- 88 Tsai MY, Bignell M, Yang F, Welge BG, Graham KJ, Hanson NQ. Polygenic Influence On Plasma Homocysteine: Association Of Two Prevalent Mutations, The 844ins68 Of Cystathionine Beta-Synthase And A(2756)G Of Methionine Synthase, With Lowered Plasma Homocysteine Levels. *Atherosclerosis*, 2000,149:131–137.
- 89 Tsai MY, Feng Y, Michelle B, Aras O, Hanson QN. Relation between Plasma Homocysteine Concentration, the 844ins68 Variant of the Cystathionine b-Synthase Gene, and Pyridoxal-5-Phosphate Concentration. *Molecular Gen and Metabol*, 1999, 67, 352–356.
- 90 Karaca M, Ozgul RK, Dundar H, Coskun T, Tokatlı A, Sivri S, Dursun A. Molecular analysis of homocystinuria in Turkish patients. 2010, *J Inherit Metab Dis*. 33 (Suppl 1): 197
- 91 Kavaklı K. Az Görülen Kanama Bozuklukları. *Türk Hematoloji Derneği Yayını*, 2009, Antalya
- 92 Peyvandi F. *Rare coagulation disorders*, 2000, Milano.
- 93 Ulutin T, Cengiz M, Yüksel A. *Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü Tıbbi Biyoloji Ders Notları 1*, Nobel Tıp Kitapevleri, 2000.
- 94 Dahlbäck B Resistance to activated protein C, the Arg506 to Gln mutation in the factor V gene, and venous thrombosis. *Thromb Haemost*, 1995, 73;739-42.
- 95 Ridker PM, Henekens CH, Lindpainter K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med*. 1995,6;332(14):912-7
- 96 Owren PA. "Parahaemophilia. Haemorrhagic diathesis due to absence of a previously unknown clotting factor". *Lancet* 1947,1 (6449): 446–51

- 97 Gitschier J, Kogan S. Mutations and a polymorphism in the factor VIII gene discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1990, 87(6): 2092–2096
- 98 Antonarakis S, Kazazian H, Edward G, Tuddenham D. Molecular etiology of factor VIII deficiency in hemophilia A. *Human mutation*; 1995, vol.5, no 1, pp. 1 – 22
- 99 Mannucci PM, Peyvandi F. Recessively inherited coagulation disorders *Blood*. . 2004,;104(5):1243-1252
- 100 Oeri J, Matter M, Isenschmid H, Hauser F, Koller F. Angeborenermangel an faktor V (parahaemophilie) verbunden mit echter haemophilie A bei zwei brudern. *Med Probl Paediatr*.1954, 1:575-588
- 101 Velloso LM, Svensson K, Pettersson RF, Lindqvist Y. The crystal structure of the carbohydrate-recognition domain of the glycoprotein sorting receptor p58/ERGIC-53 reveals an unpredicted metal-binding site and conformational changes associated with calcium ion binding. *J Mol Biol*; 2003,334: 845–51
- 102 Hauri H, Gulbrandsen S, Kappeler F, Nufer O. ER export of ERGIC-53 is controlled by cooperation of targeting determinants in all three of its domains. *Journal of Cell Science* 2003, 116, 4429-4440
- 103 Vollenweider F, Kappeler C, Hauri HP. Mistargeting of the lectin ERGIC-53 to the endoplasmic reticulum of HeLa cells impairs the secretion of a lysosomal enzyme. *J. Cell Biol* 1998,. 142:377–389.
- 104 Zhang B, Zhou J, Yuan S, Liu HH, Zheng C. Molecular basis of LMAN1 in coordinating LMAN1-MCFD2 cargo receptor formation and ER-to-Golgi transport of FV/FVIII. *Blood*. 2010, 16;116(25):5698-706
- 105 Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann NY Acad Sci*; 2001, 936: 11–30.
- 106 Spraggon G, Everse SJ, Doolittle RF. Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin. *Nature* . 1997, 389:455–462.
- 107 Kant JA, Fornace AJ Jr, Saxe D, Simon MI, McBride OW, Crabtree GR. Evolution and organization of the fibrinogen locus on chromosome 4: gene duplication accompanied by transposition and inversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82:2344–23487
- 108 Fu Y, Weissbach L, Plant PW, Oddoux C, Cao Y, Liang TJ, Roy SN, Redman CM, Grieninger G. Carboxy-terminal-extended variant of the human fibrinogen

- alpha subunit: a novel exon conferring marked homology to beta and gamma subunits. *Biochemistry* 1992, 31:11968–11972
- 109 Asselta R, Spena S, Duga S, Tenchini ML. Molecular genetics of quantitative fibrinogen disorders. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*; 2007, 5:163–173.
- 110 Blomback M, Blomback B, Mammen EF, Prasad AS. Fibrinogen Detroit—a molecular defect in the N-terminal disulphide knot of human fibrinogen? *Nature* 1968, 218:134–137
- 111 Acharya SS, Dimichele DM. Rare inherited disorders of fibrinogen. *Haemophilia*; 2008, 14:1151-1158
- 112 De Bosch NB, Mosesson MW, Ruiz-Saez A, Echenagucia M, Rodriguez-Lemoin A. Inhibition of thrombin generation in plasma by fibrin formation (Antithrombin I). *Thromb Haemost*; 2002, 88: 253–8.
- 113 Pfeifer U, Ormanns W, Klinge O. Hepatocellular fibrinogen storage in familial hypofibrinogenemia. *Pathol Incl Mol Pathol*. 1981, 36(2-3):247-55.
- 114 Arbez MN. Molecular Basis of Fibrinogen Deficiency. *J Path of Haemost and Thromb* ; 2000, 35(1-2):187-98
- 115 Hartwig J, Italiano J. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost*; 2003, 1(7): 1580-6.
- 116 Howard MA, Hutton RA, Hardisty RM. Hereditary giant platelet syndrome: A disorder of new aspect of platelet function. *J British Medical*; 1973, 4,586-588
- 117 Onder O, Weinstein A, Hoyer LW. Pseudothrombocytopenia caused by platelet agglutinins that are reactive in blood anticoagulated with chelating agents. *Blood*; 1980 56: 177-182
- 118 Seri M, Pecci A, et al. "MYH9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness." *Medicine (Baltimore)* 2003, 82(3): 203-15
- 119 Alport AC, Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *British Medical Journal*, London, 1927, I: 504-506.
- 120 Saito H, Kunishima S. "Historical hematology: May-Hegglin anomaly." *Am J Hematol* 2008, 83(4): 304-6.
- 121 Golomb E, Ma X, et al. "Identification and characterization of nonmuscle myosin II C, a new member of the myosin II family." *J Biol Chem* 2004, 279(4): 2800-8.

- 122 Straussman R, Ben-Ya'acov A, et al. "Kinking the coiled coil--negatively charged residues at the coiled-coil interface." *J Mol Biol* 2007, 366(4): 1232-42.
- 123 Verkhovsky AB, Svitkina TM, et al. "Myosin II filament assemblies in the active lamella of fibroblasts: their morphogenesis and role in the formation of actin filament bundles." *J Cell Biol* 1995, 131(4): 989-1002
- 124 Adelstein RS ,Conti MA. "Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity." *Nature* 1975, 256(5518): 597-8.
- 125 Glanzmann E. Hereditäre hamorrhagische thrombasthenie. Ein Beitrag zur Pathologie der Blutplättchen. 1918, *J Kinderkranken*; 88:113.
- 126 Braunsteiner H, Pakesch F. Thrombocytoasthenia and thrombocytopathia. Old names and new diseases. *Blood*; 1956, 11:965-976.
- 127 Caen JP, Castaldi PA, Lecrec JC, Inceman S, Larrieu MJ, Probst M, et al. Glanzmann's thrombasthenia. I. Congenital bleeding disorders with long bleeding time and normal platelet count. *Am J Med*; 1966, 44:4-26.
- 128 George JN, Caen JP, Nurden AT. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. *Blood*; 1990, 75: 1383– 95
- 129 Tomiyama Y. Glanzmann thrombasthenia: integrin alpha IIb beta 3 deficiency. *Int J Hematol.*; 2000, 72(4):448-54.
- 130 Sebastiano C, Bromberg M, Breen K, Hurford MT. Glanzmann's thrombasthenia: report of a case and review of the literature. *Int J Clin Exp Pathol.* 2010,; 3(4): 443– 447
- 131 Kannan M, Ahmed RP, Jain P, Kumar R, Choudhry VP, Saxena R. Type I Glanzmann thrombasthenia: Most Common Subtypes in North Indians. *Am J Hematol*; 2003, 74(2):139-41
- 132 Devecioğlu Ö, Ünüvar A, Akçay A, Garipardıç M, Sarıbeyoğlu E, Atay D, Tuğcu D, Karakaş Z, Anak S, Öztürk G, Ağaoğlu L. Glanzmann Trombastenisi: İstanbul Tıp Fakültesi Deneyimi. *Türk Çocuk Hematolojisi Dergisi* 2009, 2,4;29-33
- 133 Nurden AT, George JN. Inherited abnormalities of the platelet membrane: Glanzmann thrombasthenia, Bernard-Soulier syndrome, and other disorders In "Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice" VI edition. 2005, Philadelphia;987-1010.
- 134 Gröttum KA, Solum NO. Congenital thrombocytopenia with giant platelets: A defect in the platelet membrane. *Br J Haematol* 1969, 16:277-290

- 135 Tcheng JE, Berkowitz SD, Madan M .Glycoprotein IIB/IIIA Integrin Blockade. Am.Heart Ass ; 1998, 98:2629-2635
- 136 Calvete JJ. "On the structure and function of platelet integrin alpha IIb beta 3, the fibrinogen receptor". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1995, 208 (4): 346–60
- 137 D'Andrea G, Colaizzo D, Vecchione G, Grandone E, Di Minno G, Margaglione M. Glanzmann Thrombasthenia: identification 19 new mutations in 30 patients., Thromb.Haemo. 2002; 87(6):1034-1042
- 138 Nurden AT. Glanzmann Thrombasthenia. Biomed Central:1-10,2006
- 139 Akar, N. Klinik Moleküler Patolojiye Giriş. Ankara, 1999, AÜTF Antip AŞ Yayınları
- 140 Klug W and Cummings M. Essential of Genetics, Pearson Education, 2000
- 141 Öner C. Genetik Kavramlar. Ankara, Palme Yayıncılık, 2002, Altıncı Baskı
- 142 Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA.1992, Biotech. 24:99-103
- 143 Gordon B, Haire B, Kessinger A, Duggan M, Armitage J. High frequency of antithrombin 3 and protein C deficiency following autologous bone marrow transplantation for lymphoma. Bone Marrow Transplant.; 1991, 8(6):497-502
- 144 Crawford SW,Levine SR,Cochran MS, Coplin MW. Stroke after bone marrow transplantation.Brain, 2001 May;124(Pt 5):1043-51.
- 145 Akar N, Akar E, Mısırlıoğlu M, Avcu F, Yalçın A, Cin Ş. Search for Genetic Factors Favoring Thrombosis in Turkish Population. Thromb. Research. 1998, 92,2:79-82
- 146 Dai C, Zhang G. Gene Polymorphisms of Homocysteine Metabolism-Related Enzymes in Chinese Patients with Occlusive Coronary Artery or Cerebral Vascular Diseases. Thromb.Res. 2001, 104,3:187-195
- 147 Zhang B, Cunningham MA, Nichols WC et al. Bleeding due to disruption of a cargo-specific ER-to-Golgi transport complex. Nat Genet; 2003, 34: 220–5.

EKLER

EK1: A Novel Protein C Inhibitor gene mutation in pediatric stroke patients after bone marrow transplantation

EK2: A Novel 100 bp insertion in a patient with homocystinuria

EK3: Two new mutations at ERGIC-53 gene in a Turkish family

A novel protein C inhibitor gene mutation in pediatric stroke patients after bone marrow transplantation

Didem Torun · Gülhis Deda · Mehmet Ertem ·
Zümrüt Uysal · Erkan Yılmaz · Nejat Akar

Received: 7 May 2012 / Accepted: 7 May 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Protein C inhibitor is a heparin dependent serine protease inhibitor found in human plasma, urine and other body fluids. It was originally identified as an inhibitor of activated protein C. Stroke is an important cause of morbidity and mortality in the pediatric age group. In this study we analyzed the protein C inhibitor gene mutations in Turkish pediatric stroke patients. We found a missense mutation of G to A at nucleotide 6760 in exon 2, resulting in a transition serine to asparagine (p.Ser188Asp) and in a child and his father and also we found same alteration in exon 2 in an another pediatric stroke case following bone marrow transplantation.

Keywords Protein C inhibitor gene · Bone marrow transplantation · Mutation

Introduction

Blood coagulation is regulated by antithrombin III (AT), tissue factor pathway inhibitor (TFPI), heparin cofactor II

and the protein C pathway. Protein C pathway is crucial mechanism for the regulation of the coagulation. Protein C is a vitamin K-dependent serine protease enzyme that is activated when thrombin binds to its endothelial specific receptor thrombomodulin, this is called as the anticoagulant protein C pathway. In the presence of the other plasma vitamin K dependent protein, protein S, APC inactivates FVa and FVIIIa [1, 2].

Protein C inhibitor (PCI) is a heparin dependent serine protease inhibitor found in human plasma, urine and other body fluids. It was originally identified as an inhibitor of activated protein C (APC). Furthermore, it can inhibits various other proteases such as thrombin, factor Xa, factor XIa, urokinase, plasma kallikrein, prostate specific antigen (PSA) and tissue kallikrein(tKK)[3]. The inhibitory properties of PCI are different from serpins. PCI secreted in urine and is present as a complex with urokinase type plasminogen activator, so it is also known as plasminogen activator inhibitor-3 (PAI-3) [4].

The gene of PCI localized at chromosome 14q32.13 and consist of five exons, four introns. Recent studies demonstrated that this gene consists of a 5' flanking region containing several cis elements, a Sp1 binding site, an AP-2 binding site and inverted AP-2 binding site without TATA and CCAAT box sequences. PCI is a 57 kDa, 406 aminoacids single chain glycoprotein, synthesized in the liver. PCI plays a role in the regulation of the anticoagulant protein C pathway, thrombosis and fibrinolysis, fertilization, tissue regeneration, vascular permeability and tumor invasion [5, 6].

Stroke is an important cause of morbidity and mortality in the pediatric age group. It can be defined as the sudden occlusion or rupture of cerebral veins or arteries resulting in focal cerebral damage or neurological deficits. Stroke is a rare event in childhood, recent studies revealed that the

D. Torun (✉) · E. Yılmaz
Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey
e-mail: didemtorun@gmail.com

G. Deda
Neurology Department, School of Medicine, Ankara University,
Ankara, Turkey

M. Ertem · Z. Uysal
Pediatric Hematology Department, School of Medicine,
Ankara University, Ankara, Turkey

N. Akar
Pediatrics Department, TOBB Economy and Technical
University Hospital, Ankara, Turkey

incidence of pediatric stroke 1.8 per 100,000 children. However the underlying basic mechanism of stroke have been not entirely understood, individual genetic substitutions may play a role for the pathogenesis of stroke [7]. Arterial strokes, cerebral venous thrombosis have all been described in patients with hereditary protein C deficiency. Anzola and colleagues found abnormally low levels of protein C in patients with acute stroke. They suggested that low levels of protein C in the acute stroke reflect effective activation of the coagulation factors and were predictive of an adverse outcome. Early prognostic factors in ischemic stroke [8].

Recent studies demonstrated that inherited gene defects related to the coagulation system have been reported as risk factors for stroke. One of these gene defect is a G>A transition at nucleotide 1691 in exon 10 of the Factor V gene causing activated protein C resistance. The proteolytic activity of APC is regulated predominantly by protein C inhibitor (PCI) [9, 10].

In this study, we aimed to analyze the protein C inhibitor gene mutations in Turkish pediatric stroke patients.

Materials and methods

A total of 90 pediatric stroke patients admitted to our pediatric molecular genetic department and 110 healthy controls evaluated in this study. Peripheral blood was collected from patients. A written informed consent for genetic analysis was obtained from patients. DNA was isolated from by proteinase K and phenol/chloroform extraction. PCI gene (SERPINA5) was screened by polymerase chain(PCR) reaction using the primers as shown Table 1 [10]. PCR reaction was carried out in a reaction volume of 50 µl containing 50 ng of genomic DNA, 10 pmol of each primer, 0.5 U Taq polymerase, 200 µM of each dNTP and 2.5 Mm MgCl₂. PCR products were separated by electrophoresis through using 2 % agarose gel. Single strand conformation polymorphism (SSCP) was performed to find possible different band variations. SSCP was performed as follows: Aliquots of 10 µl PCR products were mixed with denaturing solution (95 % formamide,

25 mM EDTA, 0.025 % bromophenol blue) heated for 8 min in 95 °C and chilled on ice. Denatured DNA was subjected to acrylamide/bisacrylamide gel electrophoresis in Tris Boric-acid EDTA buffer at constant voltage 8–10 V/cm for 10–12 h. After electrophoresis, the gel was stained with 1 % silver nitrate gel. When SSCP yielded an abnormal band, DNA sequencing analysis of the five exons of the PCI gene were performed. (Beckman Coulter, USA).

Results

In this study, we analyzed 90 patients with pediatric stroke and 110 healthy controls. Screening of the five exons of PCI gene from these patients and controls, we detected a novel Guanine (G) to Adenine (A) nucleotide change at 6760 (Serine to Asparagine (p.Ser188Asp)) at exon 2 in a pediatric stroke patient. A 9-years-old boy was admitted to our clinic at the age of 6 months with focal seizures. He was diagnosed as Tetralogy of Fallot and CT scan revealed right temporo-occipital large hypodense area. EEG was normal and carrier of FVL. Prothrombin 20210 G-A did not present. Aspirin prophylaxis was started but he did not come to follow up.

Also, same alteration was detected in a family (father and his son) with FV 1691 G>A (FVL). A-7-years-old boy was first admitted to our clinic at the age of 3 years and was diagnosed as beta thalassemia major. Bone marrow transplantation was performed at the age of four. Four months following transplantation he had left focal seizures. His CT scan revealed left parietal hypodense area and haemorrhage around this area. His MRI revealed ischemic area at bilateral frontal, subcortical white matter and left temporo-occipital area. His EEG was epileptic at left temporo-parietal area. Later, he had right hemiparesis. His MR angiography revealed occlusion at right MCA, MI and left ICAQ was thin and ischemia was present at the area of these arteries. TPA was started and later heparin was used. After TPA his right MCA was intact. He had wild type FV and PT gene mutations.

We compared the alteration of PCI gene before and after bone marrow transplantation, and from our data, it appears

Table 1 PCR primers for PCI gene

	Forward primers	Reverse primers	Annealing temperature
Exon 1	5'CACAGTAAGTACCGATGCCG 3'	5'AGATGTCACCTAACCACCACC 3'	57
Exon 2	5'GGGACATCTCTGGAAAATCAG 3'	5'CCCCCTCTTTTATGTATGTGAG 3'	55
Exon 3	5'TGCTTCACTCCCTTTTATTTGC3'	5'GACTTGGATGTCACAGGATG 3'	54
Exon 4	5'ATTATG AATCCAAGGGCTGA 3'	5'GG AATGAAA TGGGCT AGAGT AG 3'	50
Exon 5	5'TTAGAGGTTGATGCCCATAGG 3'	5'GGAGTCTTATGAGGGCCAAA 3'	58

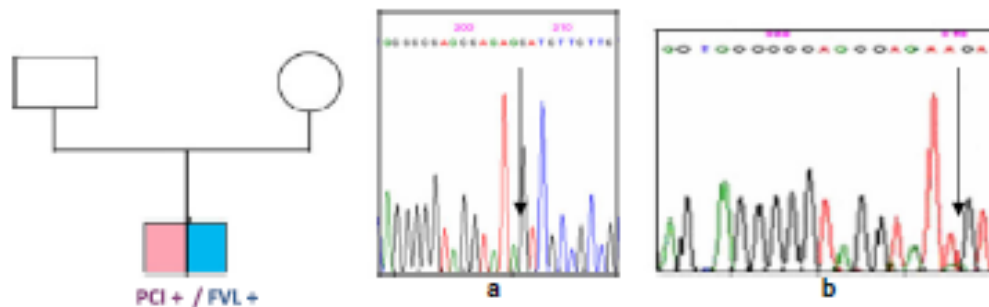


Fig. 1 a No alteration at exon 2 in PCI gene in the pediatric stroke patient (recipient) prior to bone marrow transplantation. b 6760 G>A transition at exon 2 in PCI gene in the pediatric stroke patient following bone marrow transplantation

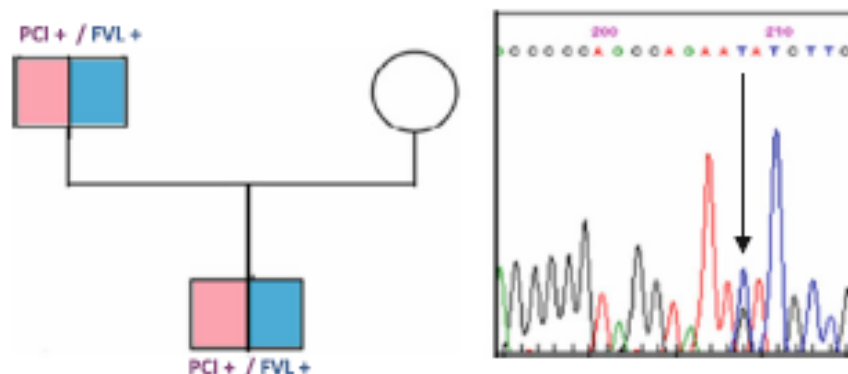


Fig. 2 In donor (father) 6760 G>A and 6761 T>C transitions at exon 2 in PCI gene of the father

that 6760 G>A transition of the mutation from recipient to donor after transplantation (Figs 1, 2). Before transplantation in donor patient revealed T to C nucleotide change at 6761 in exon 2, this nonsense mutation encode proline aminoacid. None of the control group had PCI mutation.

Internet based program that polyphen was used to determine the effect on the change in protein. This program calculates preserved sequence between species in during evolution that take into account predicted protein structure. Also, in order to compare that used "multiple alignment tool" option in NCBI database.

Discussion

Protein C, protein S, endothelial protein C receptor (EPCR), thrombin and thrombomodulin are the essential components of the protein C pathway. Protein C anticoagulant system has an important role for the regulation of the coagulation. This pathway achieves its function through the medium of active protein C (APC) and protein S. The

proteolytic activity of APC is regulated predominantly by protein C inhibitor [11, 12]. PCI is known as a serine protease inhibitor that modulates the blood clotting factors. In humans, PCI is expressed in different organs and tissues. Recent studies revealed that PCI could play role in haemostasis and thrombosis, fertilization, pulmonary hypertension, tissue repair and regeneration, tumor invasion [13, 14].

APC is a natural major anticoagulant and limits the progression of the coagulation cascade by the proteolytic degradation of FVa and FVIIIa. Previous studies revealed that gene defect in FV gene increase the risk for stroke [15]. FV Leiden mutation causes activated protein C resistance and at nucleotide 1691 guanine to adenine change leads to a replacement of glutamine to arginine at aminoacid position 506. FVL frequency in Turkish population has been reported from different parts of Turkey. The frequency was reported to range between 3.5 and 15 % in several studies [16]. Studies revealed that anti-thrombin III, protein S and protein C deficiencies also occurs following bone marrow transplantation (BMT) and

Table 2 Evolutionary process of p.S188 N transition

<i>Homo sapiens</i>	...YRALASAAPSQ	S	IFPSPVSISMSLA...
<i>Mus musculus</i>	...YRALASAAPSQ	S	IFPSPVSISMSLA...
<i>Gallus gallus</i>	...YRALASAAPSQ	S	IFPSPVSISMS-A...
<i>Canis lupus familiaris</i>	...YRALA+AAPSQ	S	IFPSPVSISMSL-...
<i>Neomacrus leucogenys</i>	...YRALASAAPSQ	S	IFPSPVSISMSLA...
<i>Leontideus africana</i>	...YRALASAAPSQ	S	IFPSP+SISMSLA...
<i>Callithrix jacchus</i>	...YRALVSADPSQ	S	IFPSP-SIS-SLAM...
<i>Bos taurus</i>	...YRALA+AAP+Q	S	IFPSPVSIS-SMSLA...
<i>Pan troglodytes</i>	...YRALASAAPSQ	S	IFPSPVSII-SMSLA...
<i>Rattus norvegicus</i>	...YRALASAAPSQ	S	++FSP+S+SMALA...

PolyPhen—<http://genetics.bwh.harvard.edu/polyphe>

investigators have described the occurrence of stroke after BMT [17, 18].

Protein C inhibitor gene alterations may have a role in the formation of stroke. The combination of protein C deficiency and other known thrombotic risk factors such as protein S and antithrombin deficiency are important for thrombosis. Besides, FV Leiden mutation is the most common genetic cause of thrombosis. We have found a 6760 G>A transition in PCI gene that carried FVL mutation after BMT in a family. Our data indicate that protein defects occurs in coagulation cascade, may inherited from donor to recipient with transplantation causing a thrombosis event.

6760 G>A transition is conserved at evolutionary process, so we can say that this transition is a novel mutation (Table 2). So far, there is no study of the relation between the stroke and PCI gene mutations. So, our study is important for it is the first study.

Further study is need to elucidate the role of PCI mutations on the occurrence of thrombosis.

References

1. Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W (1991) The coagulation cascade, initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 30: 10363–10370
2. Eimon CT (2006) Inflammation and the activated protein C anticoagulant pathway. *Semin Thromb Hemost* 1:49–60
3. Suzuki K (2008) The multi-functional serpin, protein C inhibitor: beyond thrombosis and hemostasis. *J Thromb Hemost* 6:2017–2026
4. Stief TW, Radtke KP, Heimbucher N (1987) Inhibition of urokinase by protein C-inhibitor (PCI): evidence for identity of PCI and plasminogen activator inhibitor -3. *Biol Chem Hoppe Seyler* 368:1427–1433
5. Suzuki K, Deyashiki Y, Nishioka J, Kuneki K, Akita M, Yamamoto S, Hashimoto S (1987) Characterization of cDNA for human protein C inhibitor. *J Biol Chem* 262:611–616
6. Meijjes JC, Chung DW (1991) Organization of the gene coding for human protein C inhibitor. *J Biol Chem* 266:15028–15034
7. Akar N, Yilmaz E, Akar E, Deda G, Sipahi T (2000) Factor V (His 1299 Arg) in young Turkish patients with cerebral infarct. *Haemostasis* 30:118–122
8. Annala GP, Magoni M, Ascarl E (1993) The role of protein C and protein S. *Stroke* 24:1496–1500
9. Bertina RM, Koelenan BPC, Koster T et al (1994) Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369:64–67
10. Pike RN, Buckle AM, le Bonniec BF, Church FC (2005) Control of the coagulation system by sepsis. *FERS J* 272:4842–4851
11. Gianotten J, Schimmel AW, Veen F, Lombardi MP, Meijjes CM (2004) Absence of mutations in the PCI gene in subfertile men. *Mol Hum Repro* 10(11):807–813
12. Griffin JH, Fernandez JA, Gale AJ, Mosnier LO (2007) Activated protein C. *J Thromb Haemost* 5(1):73–80
13. Laszik S, Mito A, Taylor FB, Remell G, Eimon CT (1997) Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation* 96:3633–3640
14. Meijjes JC, Herwald H (2011) Protein C inhibitor. *Semin Thromb Hemost* 37:349–354
15. Akar N, Akar E, Deda G, Sipahi T, Ocal A (1999) Factor V 1691G-A, prothrombin 20210 G-A and methylenetetrahydrofolate reductase 677C-T variants in Turkish children with cerebral infarct. *J Child Neurol* 14:740–751
16. Akar N, Factor V (2009) 1691 G-A mutation distribution in healthy Turkish population. *Turk J Hematol* 26:9–11
17. Gordon B, Häre W, Kessinger A (1991) Bone Marrow Transpl 8:497–502
18. Coplin WM, Cochran M, Levine SR, Crawford S (2000) Stroke after bone marrow transplantation. *J Child Neurol* 124(p 5): 1043–1051

A novel 110-bp insertion in a patient with homocysteinuria

Homosistinürilli bir hastada ilk kez tanımlanan 110 BÇ'lik insersiyon

Didem Torun¹, Talia İleri², Kaan Gündüz³, Nejat Akar¹

¹Department of Pediatric Genetics, Faculty of Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey

²Department of Pediatric Hematology, Faculty of Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey

³Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey

To the Editor,

Homocysteinuria is an inherited recessive disorder caused by cystathionine beta-synthase (CBS) deficiency that has a wide spectrum of clinical manifestations, including ocular lens dislocation, skeletal disproportion, osteoporosis, vascular thrombosis, and central nervous system dysfunction [1]. The CBS enzyme catalyzes the synthesis of cystathionine from homocysteine and serine in the methionine pathway. This results in accumulation of homocysteine and methionine in plasma, leading to excretion of excessive urinary homocysteine. CBS deficiency has a worldwide incidence of 1/344,000 live births (range: 1/58,000-1/1000 live births) [2].

Human CBS is located in the cytoplasm of cells and is composed of 4 identical 63-kDa subunits. The CBS gene is located on the long (q) arm of chromosome 21 at position 22.3, encodes a protein consisting of 551 amino acids, and has 16 exons [3]. Herein we report a patient with homocysteinuria that was a carrier of compound heterozygote mutations in the CBS gene, 1 of which is novel, and a discussion of the clinical and molecular findings.

A 14-year-old boy was referred to our hospital for evaluation of ocular symptoms that began approximately 1 year earlier. He was the first born of non-consanguineous parents that had lost 1 fetus. Family history of neurologic and thromboembolic disease was negative. Pregnancy and delivery were uneventful. The proband had neuro-motor developmental delay. At the age of 10 years he had a clonic seizure of the left side. He had a marfanoid face and neurological examination showed left-sided central facial palsy, and mild left hemiparesis. Complete blood count results were normal. Cranial CT showed an area of low attenuation in the left frontoparietal region consistent with infarction. Prothrombotic work-up results were as follows: serum methionine level: 4.7 mg/dL (normal: 0.09-0.6 mg/dL); free homocysteine concentration: 50 mmol/L (normal: <12.5 mmol/L); urine homocysteine concentration: 360 mmol/L (normal: 5-15 mmol/L). The patient was diagnosed as homocysteinuria, and hydroxy cobalamin injections, vitamin B6, acetyl-salicylic acid, and a low-methionine diet were started and maintained.

Address for Correspondence: M.D. Didem Torun, Department of Pediatric Genetics, Faculty of Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey

Phone: +90 543 415 36 10 E-mail: didemtorun@gmail.com

doi:10.5152/tjh.2011.44

Ophthalmological examination showed bilateral lens subluxation, bilateral cataracts, and secondary glaucoma. The patient underwent cataract extraction in both eyes via phacoemulsification. Both eyes were treated with topical anti-glaucoma drops. Additionally, the right eye underwent diode laser cyclophotocoagulation with normalization of intraocular pressure without any drops at the 1-year follow-up. Intraocular pressure in the left eye remained normal with topical anti-glaucoma drops.

Written consent was provided by the patient's parents. Following DNA extraction, all the exons of the CBS gene were screened via sequencing. Exon 8 of the CBS gene was amplified using 2 primer sets (F: 5' CTGAACATTAGGTCATTACC 3'; R: 5' TTT CACACGTTTCCCTGC 3') under standard PCR conditions, with an annealing temperature of 57°C. PCR showed a 598-bp amplified product, which was cleaned using a DNA purification kit (Metis, Turkey). Then, the sample was sequenced using a DNA sequencer (Beckman Coulter DNA sequencer, USA). Direct PCR analysis and sequencing showed a 110-bp insertion at exon 8 in the CBS gene (Figures 1 and 2). A novel 110-bp insertion starting at nt 855 up to 965 ending with a new amino acid formation was determined. In exon 8 the serine amino acid coded by TCC was altered to tryptophan (TGG) due to the 110-bp insertion. Additionally, a missense mutation at exon 8 in the CBS gene was also noted, which caused a T-C transition at base pair 833, resulting in an amino acid change from isoleucine to threonine (Figure 3). 833 T>C (p.I1278T) was previously described (HGMD_CM990350).

Discussion

We described a 14-year-old patient with homocysteinuria due to 2 mutations in the CBS gene in a compound heterozygous state. The novel 110-bp insertion mutation at the intron-exon junction of the 5' end of exon 8 affected the splicing site. An 844ins68 polymorphism was previously reported at this localization [4]. Previous research has shown that 844ins68 insertion in the CBS gene has a heterogeneous distribution in human populations. The effect of 844ins68 on homocysteine metabolism and its thrombotic effect remain speculative. The

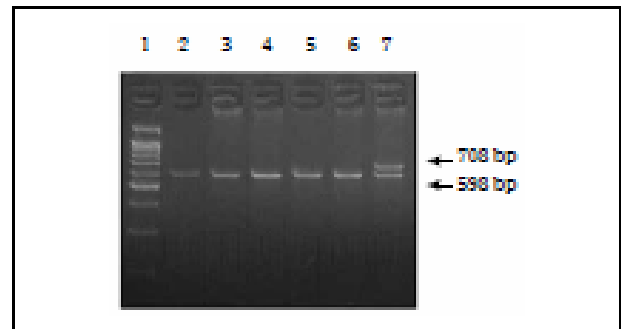


Figure 1. Agarose Gel Electrophoretic Analysis of the 110-bp Heterozygous Insertion at Exon 8 in the CBS Gene. Band 1 is the DNA Marker (30X174 HaeIII, Fermentas), and Bands 2-6 are DNA Samples for the Control. Band 7 is The Patient's PCR

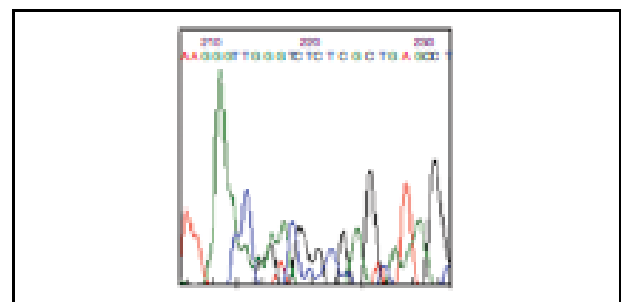


Figure 2. Starting Point of the 110-bp Insertion at Exon 8 in the CBS Gene

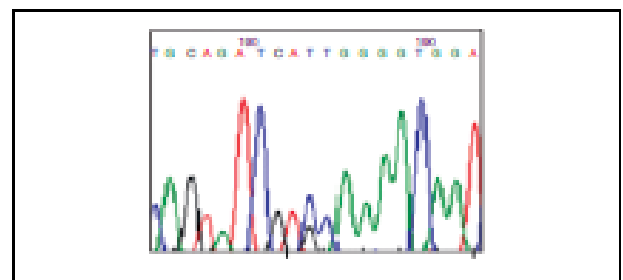


Figure 3. CBS Gene 833 T>C Transition at Exon 8

frequency of this polymorphism is 5.9% in the Turkish population [5]. The novel 110-bp insertion observed in the presented case shows that this region of the CBS gene may be a hot spot for mutations; the observed mutation and the 844ins68 variant do not overlap. In conclusion, 110-bp insertion plays an important role in homocysteine-related diseases.

Conflict of interest statement

The authors of this paper have no conflicts of interest, including specific financial interests, relationships, and/or affiliations relevant to the subject matter or materials included.

References

1. Kaur M, Kabra M, Das GP, Suri M, Verma IC. Clinical and biochemical studies in homocystinuria. *Indian Pediatr* 1995;32:1067-75.
2. Kraus JP, Janostik M, Kozich V, Mandell R, Shih V, Sperandio MP, Sebastio G, de Franchis R, Andria G, Kluijtmans LA, Blom H, Boers GH, Gordon RB, Kamoun P, Tsai MY, Kruger WD, Koch HG, Ohura T, Gaustadnes M. Cystathionine Beta-Synthase Mutations In Homocystinuria. *Hum Mutat* 1999;13:362-75. [[CrossRef](#)]
3. Münke M, Kraus JP, Ohura T, Francke U. The gene for cystathionine beta synthase (CBS) maps to the subtelomeric region on human chromosome 21q and to proximal mouse chromosome 17. *Am J Hum Genet* 1988;42:550-9.
4. Tsai MY, Bignell M, Schwichtenberg K, Hanson NQ. High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-Synthase gene. *Am J Hum Genet* 1996;59:1262-7.
5. Alcar N, Alcar E, Misirhoğlu M, Avcu F, Yalçın A, Cın Ş. Search For Genetic Factors Favoring Thrombosis in Turkish Population. *Thromb Res* 1998;92:79-82. [[CrossRef](#)]

Two New Mutations at *ERGIC-53* Gene in a Turkish Family

Didem Torun, MS,¹ Erkan Yılmaz, PhD,¹ Avni Atay, MD,²
Emin Kürekçi, MD,² and Nejat Akar, MD¹

Clinical and Applied
Thrombosis/Hemostasis
000901-1-3
© The Author(s) 2010
Reprints and permission:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/10762960835153
http://cath.sagepub.com



Abstract

Combined factor V and factor VIII deficiency (F5F8D) is a rare autosomal recessive coagulation disorder associated with plasma levels of coagulation factors V and VIII approximately 5% to 30% normal. Combined factor V and factor VIII deficiency is caused by mutations in *ERGIC53* (*LMAN1*) gene. *ERGIC-53* and multiple coagulation factor deficiency 2 (MCFD2) form a protein complex that functions as a cargo receptor transport FV and FVIII from the endoplasmic reticulum to the Golgi. The aim of this study was to determine the mutations of *ERGIC-53* (endoplasmic reticulum [ER] to the ER-Golgi intermediate compartment) gene and combined F5F8D in a family. In this study, we analyzed a patient in a Turkish family with combined F5F8D. We found a nonsense mutation of C to T at nucleotide 202 in exon 9, resulting in a transition of arginine to stop codon, and in 1 child, we found a frameshift deletion in exon 4 in *ERGIC-53* gene.

Keywords

combined FV and FVIII deficiency, *ERGIC-53*, bleeding

Introduction

Combined factor V and factor VIII deficiency (F5F8D) is an autosomal recessive disorder. F5F8D is estimated to be extremely rare (1/1 000 000) in the general population.^{1,2} Affected individuals present with a moderate bleeding tendency and plasma levels of factors V and VIII in the range of 5% to 30% of normal.³ The gene responsible for combined F5F8D was localized to the long arm of chromosome 18 and identified the disease gene as endoplasmic reticulum (ER) Golgi intermediate compartment (*ERGIC-53*).⁴

ERGIC-53, also called *LMAN1*, is reported to be 53 kDa mannose-binding type I transmembrane protein. It includes an N-terminal signal sequence, a carbohydrate recognition domain, which is calcium dependent and pH sensitive, a stalk region, a transmembrane domain, and a short cytoplasmic domain; *ERGIC-53* mainly acts as a receptor of a limited number of glycoprotein and transports them from ER to *ERGIC* and Golgi; meanwhile, it has a secondary glycoprotein quality control function. *ERGIC-53* works as a cargo receptor for efficient ER-Golgi transfer of coagulation FV and FVIII during their secretion.⁵

ERGIC-53 gene is located on chromosome 18q21.3-18q22 and contains 13 exons, whose mRNA is 2768 bp. *ERGIC-53* exist in many species, such as *Homo sapiens*, rat, mice, *Xenopus laevis*, and *Saccharomyces cerevisiae*.^{6,7}

Recent research revealed that F5F8D and some ER storage diseases have relationship with *ERGIC-53* gene. In humans, lack of functional *ERGIC-53* leads to a defect in secretion of glycoproteins. Various experiments demonstrate that F5F8D

appears to be particularly prevalent among Mediterranean.⁸ The disorder is caused by mutation of the 2 genes: *ERGIC-53* and multiple coagulation factor deficiency 2 (*MCFD2*). *ERGIC-53* and *MCFD2* form a 1:1 complex. Either *ERGIC-53* or *MCFD2* functions as a cargo receptor, transport FV, and FVIII from the ER to Golgi.⁹

In this study, we aimed to analyze the mutation data of *ERGIC-53* gene in a Turkish family.

Material and Methods

Peripheral blood was collected from a Turkish patient and his family members with combined F5F8D. A written informed consent for genetic analysis was obtained from the parents. DNA was isolated by proteinase K and phenol/chloroform extraction. All exons of the *ERGIC-53* gene were screened by polymerase chain reaction (PCR) using the primers as shown in Table 1. After PCR, PCR products were separated by electrophoresis through agarose and visualized by ethidium bromide staining. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) was performed to find possible different band

¹ Ankara University, School of Medicine, Pediatric Genetics Department, Ankara, Turkey

² GATA Medical School, Ankara, Turkey

Corresponding Author:

Didem Torun, Ankara University Pediatric Molecular Genetic Department, Ankara 06100, Turkey.

Email: didemtorun@gmail.com

Table 1. The Primers Used for the PCR Amplifications of the *ERGIC-53* Gene

	Forward Primers	Reverse Primers
Exon 1	5'-TCG CGT TCC AGA ATC CAA G-3'	5'-TCA GCA CAC CAG GGT AGC-3'
Exon 2	5'-CAG TTT GGA AAT GTA CAT TGA G-3'	5'-GGG AAC AGT TAG AGG CTA G-3'
Exon 3	5'-CAT GCC TCT AAC TGT TCC C-3'	5'-CTC ACA GCC TAA CTC TGT TG-3'
Exon 4	5'-TGT AAG TCA CTT CAT AGT AC-3'	5'-CAA TGT ATT TCA TAA GGA TTC C-3'
Exon 5	5'-TGA AAA GCT GAG TGT CTT GT-3'	5'-GAA AAG TGA TAC TGT AAC ATT G-3'
Exon 6	5'-GAA ACA AAA CTG AAT AGT AGT C-3'	5'-ACA AGT CTA CAT ATC CCT AA(AGC)-3'
Exon 7	5'-AGA GTG CCA TTG CCT TTA CC-3'	5'-CAA ACC TAA GTT AGT CTT CC-3'
Exon 8	5'-CAT GTA TAG AGA TAT CTT AAT G-3'	5'-GTC CAT GAT CAA CAG CCT C-3'
Exon 9	5'-CAC TTT GGT CAC TTA CGT TA-3'	5'-TCT ATG AGC ACA TAG TAC AG-3'
Exon 10	5'-GGG AAG TAA AGA AGA AGG GC-3'	5'-AAT CAC ATA ACA CAC AAA CG-3'
Exon 11	5'-GTG ATT TTA TTG TAT CAA GAG-3'	5'-AGT ATG AGT TCT TCC TTT CC-3'
Exon 12	5'-GGG GAT AGA AGG TTT TCT GG-3'	5'-GAA CAT AGA TAA CTT AGT TG-3'
Exon 13	5'-CTG TTC ATT TCA GTT CAC AT-3'	5'-AAT TCC CTC AAA ACG ACA TC-3'

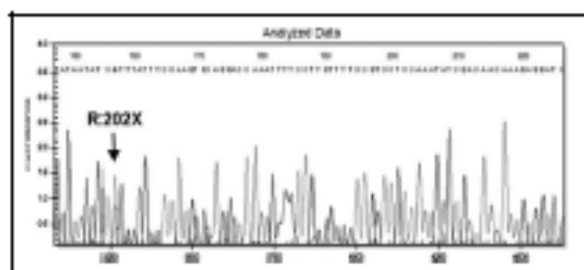


Figure 1. Sequencing analysis of exon 9 of *ERGIC-53* gene.

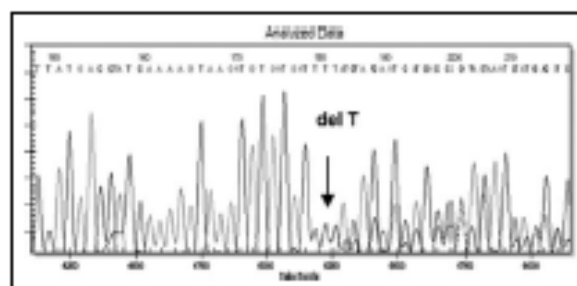


Figure 2. Sequencing analysis of exon 4 of *ERGIC-53* gene.

variations between the participants. Single-strand conformation was performed as follows: aliquots of 10 μ L of the PCR products were mixed with denaturing solution (95% formamide, 25 mmol/L EDTA, 0.025% xylene cyanole, and 0.025% bromophenol blue), heated for 10 minutes at 95°C, and chilled on ice. Denatured DNA was subjected to acrylamide bisacrylamide gel electrophoresis in Tris-boric acid EDTA buffer at constant voltage (150 V) for 8 to 10 hours. The gel was stained with 0.1% silver nitrate. When SSCP elicited an abnormal band, sequencing of the gene was performed (Beckman Coulter CEQ 8000; Beckman Coulter, USA).

Results

Screening the 13 exons of the *ERGIC-53* gene from a Turkish patient with combined F5F8D revealed a C to T nucleotide change at 202 in exon 9, resulting in a transition of arginine to a stop codon (Figure 1) and a thymine deletion in exon 4 at nucleotide 157 in *ERGIC-53* gene (Figure 2).

Although the mother and father are consanguineous, we defined a compound heterozygosity state in this family. Family's plasma levels are shown in Figure 3.

Discussion

Hereditary multiple coagulation factor deficiencies are extremely rare. This disorder appears to be particularly

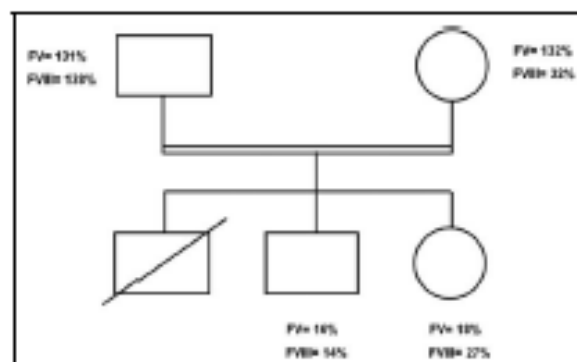


Figure 3. Family's tree and FV and FVIII plasma levels.

prevalent among Middle Eastern Jews and non-Jewish Iranians and over half of the families from the Mediterranean region.^{8,10} Previous data revealed that *ERGIC-53* is a significant transmembrane protein. Besides transporting some specific glycoproteins, it also has a quality control function, and combined F5F8D is caused by mutation in *ERGIC-53*. Mutation in *ERGIC-53* gene accounts for most cases of F5F8D. Up to now, only about 150 cases with combined F5F8D are reported in the literature,^{6,12} and only 38 different mutations in the *ERGIC-53(LMAN1)* gene have been described.¹³ However, it

is likely that F5F8D is underdiagnosed, in part due to its often mild bleeding manifestations. Some of the patients with F5F8D may be misdiagnosed as having mild hemophilia. So more attention should be exerted to patient with mild bleeding symptoms. In Turkish population, several cases were reported.^{6,11}

These 2 mutations change C to T at nucleotide 202 in exon 9 and timine deletion at nucleotide 157 in exon 4 are reported for the first time. One of them ended with a stop codon.

Declaration of Conflicting Interest

The authors declared no conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

Funding

The author received no financial support for the research and/or authorship of this article: Mutations were detected during routine screening for ERGIC-53.

References

1. Oeri J, Matter M, Isenachmid H, Hauser F, Köfler F. Angeborener mangel an faktor V (parahaemophilie) verbunden mit echter haemophilie A beim zwei brüdern. *Med Probl Paediatr*. 1954;1:575-588.
2. Mamucci PM, Peyvandi F. Recessively inherited coagulation disorders. *Blood*. 2004;104(5):1243-1252.
3. Peyvandi F, Tuddenham EG, Akhtari AM, Lak M, Mamucci PM. Bleeding symptoms in 27 Iranian patients with the combined deficiency of factor V and factor VIII. *Br J Haematol*. 1998;100(4):773-776.
4. Zhang B, Cunningham MA, Nichols WC, et al. Bleeding due to disruption of a cargo-specific ER-to-Golgi transport complex. *Nat Genet*. 2003;34(2):220-225.
5. Hauri HP, Kappeler F, Andersson H, Appenzeller C. ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J Cell Sci*. 2000;113(pt 4):587-596.
6. Nichols WC, Terry VH, Wheatley MA, et al. ERGIC-53 gene structure and mutation analysis in 19 combined factors V and VIII deficiency families. *Blood*. 1999;93(7):2261-2266.
7. Eilers M, Shekar SC, Shieh T, Smith SO, Fleming PJ. Internal packing of helical membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(11):5796-3801.
8. Seligsohn U, Zivelin A, Zwiang E. Combined factor V and factor VIII deficiency among non-Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*. 1982;307(19):1191-1195.
9. Zhang B, Kaufman RJ, Ginsburg D. LMAN1 and MCFD2 form a cargo receptor complex and interact with coagulation factor VIII in the early secretory pathway. *J Biol Chem*. 2005;280(27):25881-25886.
10. Segal A, Zivelin A, Rosenberg N, Ginsburg D, Shpilberg O, Seligsohn U. A mutation in LMAN1 (ERGIC-53) causing combined factor V and factor VIII deficiency is prevalent in Jews originating from the island of Djerba in Tunisia. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004;15(1):99-102.
11. Zhang B, Spreafico M, Zheng C, Yang A, Callaghan MU, Avci Z. Genotype-phenotype correlation in combined deficiency of factor V and factor VIII. *Blood*. 2008;111(12):5592-5600.
12. Neerman-Arbez M, Johnson KM, Morris MA, et al. Molecular analysis of the ERGIC-53 gene in 35 families with combined factor V-factor VIII deficiency. *Blood*. 1999;93(7):2253-2260.
13. Farah RA, De Moerloose P, Bouchardy I, et al. Combined factor V-factor VIII deficiency (F5F8D): compound heterozygosity for two novel truncating mutations in LMAN1 in a consanguineous patient. *Thromb Haemost*. 2006;95(5):893-895.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Didem TORUN
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 23 Temmuz 1983
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Çankaya Kılıçarslan Süper Lisesi

Lisans: Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yayımlar

Hakemli Dergilerde Yer Alan Makaleler

1. **Torun D**, Yılmaz E, Atay A, Kürekçi E, Akar N. Two New Mutations at ERGIC-53 Gene In a Turkish Family. Clin Appl Thromb Hemost. 2011 Jun;17(3):248-50. Epub 2010 May 11.
2. **Torun D**, Yılmaz E, Akar E, Akar N. Role of ZIP14 (SLC39A14) Gene Histidine Rich Regions in Neural Tube Defects. Egyptian Journal of Medical Human Genetics,2011.
3. **Torun D**, İleri T, Gündüz K, Akar N. A Novel 110 bp Insertion In A Patient with Homocystinuria. Turkish Journal of Hematology, 2011
4. Houcher B, Houcher Z, Touabti A, Begag S, **Torun D**, Eğin Y, Akar N, Kadour F. Association of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and cystathionine β -synthase polymorphisms in cardiovascular disease in the algerian population. Genet Test Mol Biomarkers. 2010 Dec;14(6):775-80. Epub 2010 Oct 12.
5. Yılmaz E, Güleç S, **Torun D**, Haznedaroğlu IC, Akar N. The Effects of Ankaferd Blood Stopper on transcription factors in HUVEC and erythrocyte protein profile. Turkish Journal of Hematology , 2010 Apr 30

6. **Torun D**, Sarper N, Akar N. A Novel Mutation at Fibrinogen Beta Chain Gene: 5321 T>C (P.L198P) Egyptian Journal of Medical Human Genetics, 2013 (submitted)
7. **Torun D**, Deda G, Ertem M, Uysal Z, Yılmaz E, Akar N. A Novel Protein C Inhibitor Gene Mutation in Pediatric Stroke Patients after Bone Marrow Transplantation. Molecular Biology Reports, 2013, May 7.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler

A Novel 110 bp Insertion In A Patient with Homocystinuria, Poster, 2010, Milan, Italy
Mutation Analyses in Turkish Rare Blood Diseases, 18th Congress of the European Hematology Association, 2013, Stockholm, Sweden

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

FVFXVIII Kombine Eksikliği Bulunan Bir Ailede ERGIC-53 Gen Taraması-35. Ulusal Hematoloji Kongresi Poster, , İzmir

FVFXVIII Kombine Eksikliği Bulunan Bir Bireyde ERGIC-53 Gen Taraması-Poster,36. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya

Trombogenetik Sempozyumu, Sözlü Sunum, İstanbul, Mart 2009

Nadir Görülen Kan Hastalıklarında Belirlenen Gen Değişimleri.Poster, 37. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya

FVL Pozitif Pediatrik İnmeli İki Olguda Protein C İnhibitör Geninde İlk Kez Tanımlanan Bir Gen Değişimi: S188N. Sözlü Sunum, 36. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya

Marmara Üniversitesi, II. Prof.Dr. Orhan Ulutin Tromboz Sempozyumu, Sözlü Sunum, Nisan 2010

56th SSC Annual ISTH Conference, Hematology Medical Congress, May 2010 Cairo, Egypt

Glanzmann Trombastenili Türk Hastalarda Mutasyon Analizi, İlk kez Tanımlanan Beş Yeni Mutasyon, Sözlü Sunum, 37. Ulusal Hematoloji Kongresi, Ankara

Dev Trombosit Sendromlu Türk Hastalarda MYH9 Mutasyon Analizi, Poster Sunum, 38. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya

Burslar ve Ödüller

- TÜBİTAK 2210- Yurtiçi Yüksek Lisans Programı Bursiyerliği (2006-2008)
- TÜBİTAK 2211- Yurtiçi Doktora Programı Bursiyerliği (2008-2013)
- 34.Ulusal Hematoloji Kongresi, 8-11 Ekim 2008, İzmir. Genç Araştırmacı Ödülü
- Young Investigator Award From the 56th Annual Meeting of the Scientific and Standardization Committee of ISTH, Cairo, Egypt, 2010
- 36. Ulusal Hematoloji Kongresi, Genç Araştırmacı Kongre Katılım Bursu, 3-6 Kasım 2010, Antalya
- 37. Ulusal Hematoloji Kongresi, Genç Araştırmacı Kongre Katılım Bursu, 19-21 Ekim 2011, Ankara
- 38. Ulusal Hematoloji Kongresi, Deneysel Hematoloji Ödülü, 31 Ekim-4 Kasım 2012, Antalya
- Young Investigator Travel Grants- 18th Congress of the European Hematology Association (EHA18), 13-17 Haziran 2013, İsveç

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR

1. **Torun D**, Yılmaz E, Atay A, Kürekçi E, Akar N. Two New Mutations at ERGIC-53 Gene In a Turkish Family. Clin Appl Thromb Hemost. 2011 Jun;17(3):248-50. Epub 2010 May 11
2. **Torun D**, İleri T, Gündüz K, Akar N. A Novel 110 bp Insertion In A Patient with Homocystinuria. Turkish Journal of Hematology, 2011
3. **Torun D**, Deda G, Ertem M, Uysal Z, Yılmaz E, Akar N. A Novel Protein C Inhibitor Gene Mutation in Pediatric Stroke Patients after Bone Marrow Transplantation. Molecular Biology Reports, 2013, May 7.